

**Screening-Automation auf Basis
hohlkugelverkapselter Zellen
und
enzymatische Bildung von Difructoseanhydrid III aus Inulin
unter thermophilen Bedingungen
(Screening, Charakterisierung, Immobilisierung)**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer.-nat.)

genehmigte

Dissertation

von

Ulrich Jahnz

aus Minden/Westfalen

1. Referent: Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop

2. Referent: PD Dr. Siegmund Lang

eingereicht am: 05.07.2001

mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.10.2001

With a suddenness that startled them all the wizard sprang to his feet. He was laughing! 'I have it!' he cried. 'Of course, of course! Absurdly simple, like the most riddles when you see the answer.'

Picking up his staff he stood before the rock and said in a clear voice: *Mellon!*

The star shone out briefly and faded again. Then silently a great doorway was outlined, though not a crack or joint had been visible before. Slowly it divided in the middle and swung outwards inch by inch, until both doors lay back against the wall. Through the opening a shadowy stair could be seen climbing steeply up; but beyond the lower steps the darkness was deeper than the night. The Company stared in wonder.

'I was wrong after all,' said Gandalf, 'and Gimli too. Merry, of all people, was on the right track. The opening word was inscribed on the archway all the time! The translation should have been: *Say "Friend" and enter.* I had only to speak the Elvish word for *friend* and the doors opened. Quite simple. Too simple for a learned lore-master in these suspicious days! Those were happier times. Now let us go!'

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

JAHNZ, U., SCHUBERT, M., BAARS-HIBBE, H., WALTER, M., VORLOP, K.-D. (2000). Thermotolerant inulase II for production of DFA III from inulin. *In: Biotechnology 2000 – World Congress on Biotechnology (Berlin)* Abstracts, 1, 289.

SCHUBERT, M., JAHNZ, U., VORLOP, K.-D. (2001) Gentechnisches Enzymdesign und Fremdgenexpression: thermostabile Inulase II zur Produktion von DFA III aus Inulin. *In: 19. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen (Leipzig)* Kurzfassungen der Präsentation, 59.

JAHNZ, U., SCHUBERT, M., BAARS-HIBBE, H., WALTER, M., VORLOP, K.-D. (2001) Thermotolerante Inulase II für die Herstellung von DFA III aus Inulin. *In: 7. Symposium Nachwachsende Rohstoffe für die Chemie (Dresden)* Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe, Landwirtschaftsverlag Münster (im Druck).

Inhaltsverzeichnis

1	Screening-Automation – Einleitung und Stand der Technik	1
1.1	Motivation für Screening-Programme	1
1.2	Ansätze für (Ultra)high Throughput Screening	2
1.2.1	Miniaturisierung der Proben	2
1.2.2	Analytik für HTS-Aufgaben	3
1.2.3	Diversa-Strategie zur Enzymfindung	4
1.3	Mikrobioreaktoren als Screening-Tool	4
1.3.1	Anreicherung – Isolierung – Selektion	4
1.3.2	Einschluss von Zellen in Vollperlen	5
1.3.3	Neue Strategie zum Konzept der Mikrobioreaktoren	6
1.4	Aufgabenstellung	7
2	Aufbau des Screening-Automaten	8
2.1	Vorüberlegungen	8
2.1.1	Konzept des geplanten Screening-Automaten	8
2.1.2	Festlegung des Programmablaufplanes	9
2.1.3	Festlegung der wesentlichen Parameter	10
2.2	Beschreibung der Hardware	11
2.2.1	Grundsätzlicher Aufbau	11
2.2.2	Rechnerplattform und zentrale Pipettiereinheit	11
2.2.3	Ansteuerung von Relais und Schrittmotoren	12
2.2.4	Bewegung der Vial-Trays und Mikrotiterplatten	14
2.2.5	Pipettiervorgänge und Vial-Transport	15
2.2.6	Vereinzelung von Hohlkugeln und visuelle Bewertung	15
2.2.7	Öffnen und Schließen von Vials	17
2.2.8	Beschriftung und Identifizierung der Proben	18
2.2.9	HPLC-Analyse nach der Nachinkubation	18
2.2.10	Zusammenführung der Hardwarekomponenten	20

2.3	Beschreibung der entwickelten Software	21
2.3.1	Auswahl der Entwicklungsumgebung Delphi	21
2.3.2	Grundsätzlicher Aufbau	22
2.3.3	Funktionsweise und Programmierung der Containerkomponente	23
2.3.4	Aufbau und Eigenschaften der weiteren Elemente	25
2.3.5	Beschreibung der bereitgestellten Befehle	29
3	Screening-Automation – Ergebnisdiskussion und Ausblick	35
3.1	Durchführung von Mikro-MPN-Bestimmungen	35
3.2	Herstellung und Einsatz von Mikrobioreaktoren	36
3.3	Bewertung der einzelnen Automatenkomponenten	38
3.3.1	RSP-Automat, Pumpen, CCD-Kamera, Scanner, Schaltventil	38
3.3.2	Eigenkonstruktionen und ihre Ansteuerung	39
3.3.3	Vereinzelung der Perlen	39
3.3.4	Eignung der entwickelten Software	40
3.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	40
4	DFA III – Einleitung und Stand der Forschung	42
4.1	Fructane, Fructooligosaccharide und Inulin	42
4.1.1	Speicherstoff Inulin	43
4.1.2	Inulinsynthese in Pflanzen	43
4.1.3	Technische FOS-Produktion	44
4.1.4	Enzymatische Reaktionen an Fructanen	44
4.2	Anwendungen für Inulin und Fructooligosaccharide	46
4.2.1	Anwendungen im Non-Food-Bereich	46
4.2.2	Inulin und FOS in der Ernährung	48
4.3	Einsatz als Zuckeraustauschstoff	49
4.3.1	Zuckerstoffe, Süßstoffe und Zuckeraustauschstoffe	49
4.3.2	DFA III als neuer Zuckeraustauschstoff	50
4.4	Prozessführung: Thermophilie und Immobilisierung	52
4.4.1	Löslichkeit von Inulin und weitere Aspekte	52
4.4.2	Standzeit und Kontamination bei unsterilem Betrieb	52
4.4.3	Grundlagen der Immobilisierung	53
4.4.4	Immobilisierung von Inulase II	54
4.4.5	Hydrogele aus Alginat, Polyvinylalkohol und Curdlan	55
4.5	Aufgabenstellung	57

5	Manuelles Screening nach neuen DFA-III-Bildnern	59
5.1	Grundüberlegungen und Medienkomposition	59
5.2	Inulinauswahl und -behandlung	60
5.3	Screening nach mesophilen und thermophilen Bakterien	61
5.4	FOS-Bildung durch <i>u0161</i>	63
5.5	Stammvergleich der DFA-III-Isolate	64
5.6	Temperaturstabilität der Neuisolate	66
5.7	Umsetzung von Inulin mit <i>u0141</i>	66
5.8	Stammbeschreibung für <i>u0141</i>	67
5.9	Diskussion der Screening-Ergebnisse	68
6	Charakterisierung der Inulase II	70
6.1	Aufkonzentrierung	70
6.1.1	Rotationsverdampfung	70
6.1.2	Ammoniumsulfatfällung	71
6.2	Eigenschaften des Enzymes	72
6.2.1	Größenbestimmung und isoelektrischer Punkt	72
6.2.2	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz	73
6.2.3	pH-Wert-Einfluss und Temperaturstabilität	74
6.2.4	Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante	75
6.3	Zusammenfassende Diskussion der Enzymeigenschaften	76
7	Fermentation von <i>E. coli</i> MSiftOptR	78
7.1	Beschreibung und Herkunft des Organismus	78
7.2	Auswahl des Fermentationsmediums	79
7.2.1	Einsatz von IPTG als Induktor	79
7.2.2	Zusatz von Hefeextrakt, Glucose und Glycerin	79
7.3	Fermentationsverlauf	81
7.4	Diskussion und Ausblick	83
8	Immobilisierung von Inulase II	84
8.1	Zielsetzung	84
8.2	Orientierungsversuche zur Quervernetzung	84
8.2.1	Einfluss des Glutardialdehyds	85
8.2.2	Reaktionszeit und Stabilität des gebildeten Netzwerkes	86
8.2.3	Weitere Parameter zur Quervernetzung und Zusammenfassung	87

8.3	Auswahl der Matrix für den Hydrogeleinschluss	87
8.3.1	Einschluss in Curdlan-Gele	88
8.3.2	Einschluss in Polyvinylalkohol – LentiKats	88
8.3.3	Einschluss in Calciumalginat	89
8.4	Immobilisierung des Enzymes aus <i>E. coli</i> MSiftOptR	89
8.4.1	Parameteroptimierung zur Quervernetzung	89
8.4.2	Alginatperlen nach dem JetCutter-Verfahren	91
8.4.3	Aktivität der Biokatalysatorperlen	92
8.4.4	Abschätzung des zu erwartenden Katalysatorwirkungsgrades	93
8.5	Diskussion und Ausblick	94
9	Zusammenfassung	96
A	Ergebnisübersichten	98
A.1	Steuerplatinen für den Screening-Automaten	98
A.2	Quelltexte zum Programm „Screening-of-Microbeads“	99
A.3	Screeningergebnisse	100
A.4	Immobilisierungsergebnisse	101
B	Material und Methoden	103
B.1	Mikro-MPN-Versuche mit <i>Enterococcus faecium</i>	103
B.2	Arbeiten mit Mikrobioreaktoren	103
B.2.1	Herstellung von Alginathohlkugeln	103
B.2.2	Bestimmung der Stabilität von Hohlkugeln	105
B.3	Stoffanalytische Methoden	105
B.3.1	DFA-III-Analytik mittels HPLC	105
B.3.2	Bestimmung des Polymerisationsgrades von Inulin	106
B.3.3	FOS-Analytik mittels Dionex-HPLC	107
B.3.4	HPLC-Analytik organischer Säuren	107
B.3.5	Fettsäureanalyse mittels FAME-GC	107
B.3.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	108
B.4	Bestimmung der Inulase-II-Aktivität	109
B.4.1	Standardaktivitätstest	109
B.4.2	Untersuchung bei verschiedenen pH-Werten	109
B.4.3	Test für Enzyme aus gentechnisch veränderten Organismen	110
B.4.4	Aktivitätstests für Alginatimmobilisate	110

B.5	Mikroskopische Untersuchungen	111
B.6	Arbeiten mit DFA-III-bildenden Mikroorganismen	111
B.6.1	Inkubationsbedingungen	111
B.6.2	Inulinmedium JIM2	112
B.6.3	Inulinmedium JIM5	112
B.6.4	Screening nach DFA-III-bildenden Bakterien	113
B.6.5	Kultivierung im 0,5-L-Fermenter	114
B.6.6	Stoffwechselphysiologische Untersuchungen	115
B.7	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	116
B.7.1	Anzucht von Stämmen in LB-Medium	116
B.7.2	Einfluss verschiedener Mediumszusätze	116
B.7.3	Bestimmung der Zellzahl und der BTM von <i>E. coli</i> -Kulturen	117
B.7.4	Fermentation von <i>E. coli</i>	117
B.7.5	Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator	119
B.8	Charakterisierung des Enzymes Inulase II	119
B.8.1	Aufkonzentrierung im Rotationsverdampfer	119
B.8.2	Dialyse von Proteinlösungen	119
B.8.3	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	120
B.8.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	120
B.8.5	Isoelektrische Fokussierung von Proteinen	120
B.8.6	Blotting von Proteinen	121
B.8.7	Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante	121
B.9	Immobilisierung der Inulase II	122
B.9.1	Quervernetzung mit Glutardialdehyd	122
B.9.2	Einschluss in Curdlan-Gele	123
B.9.3	Einschluss in Polyvinylalkohol	123
B.9.4	Einschluss in Alginat	123
C	Hilfsmittel, Listen und Verzeichnisse	124
C.1	Herstellung von Ammoniumsulfatlösungen	124
C.2	Berechnung des Katalysatorausnutzungsgrades	125
C.3	Abkürzungsverzeichnis	126
C.4	Internetadressen der aufgeführten Firmen	127
	Literaturverzeichnis	129

Abbildungsverzeichnis

1.1	Bildung von Voll- und Hohlkugeln	6
2.1	Screening-Ansatz auf Basis von Mikrobioreaktoren	8
2.2	Programmablaufplan des Screening-Automaten	10
2.3	Geplanter Aufbau des Screening-Automaten (Aufsicht)	11
2.4	Abbildung der montierten Relais-Platinen	14
2.5	Abbildung der Verfahrstrecke und des Portals zum Deckelheben	14
2.6	Pipettier- und Greifarm am RSP9652	15
2.7	Ansaugvorgang für eine Perle	16
2.8	Vorlagegefäß und Fangkorb in der Übersicht	16
2.9	Einheit zum Zuschrauben von Vials	17
2.10	Stellungen am HPLC-Schaltventil	18
2.11	Abbildung des Probensamplers	19
2.12	Übersichtsabbildung über das Zusammenspiel der Hardwarebauteile	20
2.13	Foto des entwickelten Automaten	21
2.14	Graphischer Aufbau von TElementContainer	23
2.15	Bildschirmdialog von TProgEditDialog	24
2.16	Bildschirmdialog von TMotorEditDialog	26
2.17	Bildschirmdialog von TCCDEditSettingsDialog	27
2.18	Bildschirmdialog von TRSPPositioningDialog	28
2.19	Bildschirmausgabe des Hauptprogrammes	30
3.1	Sterile und bewachsene Mikrobioreaktoren	37
4.1	Chemische Struktur von Saccharose, Inulin und Inulobiose	42
4.2	Modell der Biosynthese von Fructooligosacchariden	44
4.3	Reaktionswege des enzymatischen Abbaus von Inulin	45
4.4	Chemische Struktur von DFA III	51
4.5	Immobilisierungsmethoden für Enzyme	54
4.6	Vernetzungsreaktion zwischen Enzym, Chitosan und Glutardialdehyd	55

4.7	Hydrogele aus Alginat, Polyvinylalkohol und Curdlan	56
5.1	Vergleich von Inulintypen	61
5.2	HPLC-Chromatogramm für den Stamm <i>u0161</i>	63
5.3	HPLC-Chromatogramm für den Stamm <i>u0161</i>	63
5.4	FAME-Analyse der neuisolierten DFA-III-Bildner	65
5.5	Temperaturstabilität der Inulase-II-Aktivität der Neuisolat	66
5.6	Kultivierung von <i>u0141</i> in JIM2-Medium	67
5.7	Mikroskopische Aufnahme von <i>u0141</i>	68
6.1	Aufkonzentrierung durch Rotationsverdampfung	71
6.2	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	72
6.3	Größenbestimmung per SDS-PAGE	73
6.4	pH-Wert-Abhängigkeit der Inulase-II-Aktivität	74
6.5	Temperaturstabilität der Inulase II	75
6.6	Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante	76
7.1	Mediumsvergleich für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	80
7.2	Anfangswachstum bei verschiedenen Glycerinkonzentrationen	81
7.3	Verlauf der Fermentation von <i>E. coli</i> MSiftOptR	82
8.1	Einfluss verschiedener Mengen an Glutardialdehyd	85
8.2	Einfluss verschiedener Chitosankonzentrationen	86
8.3	Einfluss verschiedener Chitosan- und Glutardialdehydkonzentrationen	90
8.4	Partikelgrößenverteilung und Katalysatorteststand	91
8.5	Quervernetztes Produkt und Alginatperle mit Enzymflocken	92
8.6	Einfluss der Perlengröße auf die Aktivität	92
A.1	Schaltplan und Bestückung der Steuerplatinen	98
B.1	Apparatur zum aseptischen Herstellen von Hohlkugeln	104
B.2	Beispielchromatogramm der DFA-Bestimmung	106
B.3	Foto des Kleinfermenters	114
B.4	Zellzahlbestimmung mittels OD ₆₀₅ -Messung	117
B.5	Foto des Fermenters NLF22 einschl. Steuerungseinheit	118
C.1	Abschätzung des Molekulargewichtsparameters α	125
C.2	Abschätzung des Katalysatorausnutzungsgrades η	125

Tabellenverzeichnis

2.1	Barcode-Etiketten für die Beschriftung von Vials	18
4.1	Übersicht inulinhaltiger Pflanzen	43
4.2	Inulinproduzenten	43
5.1	Inulinmedium JIM2 mit Erklärungen	60
5.2	Physiologische und morphologische Eigenschaften von <i>u0141</i>	69
6.1	Eigenschaften DFA-bildender Enzyme in der Übersicht	77
8.1	Gemessene und berechnete Katalysatorausnutzungsgrade	94
B.1	Analytik von DFA III, Übersicht	106
B.2	Analytik org. Säuren, Übersicht	107

Kapitel 1

Screening-Automation – Einleitung und Stand der Technik

1.1 Motivation für Screening-Programme

Die modernen Bio- und Chemiewissenschaften setzen zunehmend auf Screening-Programme¹. Abhängig von der Fragestellung haben diese Programme unterschiedliche Ziele:

- Bereitstellung neuer Moleküle oder Makromoleküle als Grundstoff für neue Pharmazeutika, z. B. mit inhibitorischer Wirkung gegen bestimmte (humane) Enzyme bzw. mit antibakterieller, antiviraler oder fungizider Wirkung (ALLSOP, 1998). Riesige Substanzbibliotheken aus historischen Sammlungen bekannter Einzelverbindungen, aus Naturstoffextrakten oder aus kombinatorischen Bibliotheken werden gezielt auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Die kombinatorische Chemie setzt dabei auf die Festphasensynthese, bei der gebunden an eine Oberfläche z. B. alle Variationen eines Hexapeptids ($6^{20} = 64$ Millionen Kombinationen) synthetisiert werden (ASCHE, 1996).
- Isolierung neuer Enzyme, die eine bisher nicht beschriebene Biokonversion durchführen bzw. stabiler hinsichtlich pH-Bereich, Temperatur oder Lösungsmittelverträglichkeit sind als bisher verfügbare Enzyme.
- Modifikation bekannter Enzyme, um Eigenschaften wie Temperaturstabilität oder Enantioselektivität (JAEGER *et al.*, 1999) zu beeinflussen oder das Edukt- und/oder Produktspektrum zu verändern. Diese Arbeiten werden häufig auch als zielgerichtete Evolution („directed evolution“) bezeichnet (ARNOLD, 1996).
- Isolierung neuer pro- oder eukaryontischer Mikroorganismen, die in einer mehrstufigen Reaktion entweder Schadstoffe abbauen oder Wertstoffe aufbauen. Dies gilt besonders

¹ „to screen“ (engl.) = durchsieben, überprüfen, mustern

für die schon angesprochene Bereitstellung von Grundstoffen für die chemische Industrie aus nachwachsenden Rohstoffen mithilfe mikrobiologischer Prozesse.

Den Stellenwert des Screenings als interdisziplinärer Aufgabe der Wissenschaften Biotechnologie, Chemie, Bioinformatik, Maschinenbau und Robotik unterstreichen eine zunehmende Anzahl an Veröffentlichungen in Fachzeitschriften und Fachkongresse eigens zu diesem Thema. Auf der Fachmesse für Chemieingenieurwesen,ACHEMA 2000, fand z. B. als Sonderveranstaltung mit eigenem Ausstellerbereich das „1st International Symposium on Synthesis, Screening and Sequencing“ statt.

Der Erfolg eines Screening-Programmes hängt dabei zu einem großen Teil von dem Durchsatz ab, mit dem Proben bearbeitet werden können. Übersteigt die Probenanzahl die mit manuellen Methoden bei vertretbaren Kosten untersuchbare Menge, so werden entsprechende Strategien als „High Throughput Screening“ (HTS) bezeichnet. Ab einem Durchsatz von 100.000 Proben pro Tag spricht man von „Ultrahigh Throughput Screening“ (UHTS) (THIERICKE *et al.*, 2000).

1.2 Ansätze für (Ultra)high Throughput Screening

Um den Probendurchsatz pro Zeit zu maximieren, müssen drei wesentliche Kriterien erfüllt sein:

- Alle Arbeitsschritte sind vollständig automatisiert.
- Die zu bearbeitenden Probenvolumina sind möglichst klein.
- Eine schnelle und spezifische Analytik steht zur Verfügung.

Bei der Automatisierung sind im Verlauf der vergangenen Jahre deutliche Fortschritte zu verzeichnen. Für alle wesentlichen Arbeitsgänge (exaktes Pipettieren, Transport von Inkubationsgefäßen, Analyse von Flüssigproben, Auswertung) sind heute Laborautomaten erhältlich. Die ursprünglich speziell für Laborzwecke entwickelten und sehr teuren Robotersysteme werden dabei zunehmend durch Standard-Industrieroboter ersetzt (STAHL, 1998). In der Literatur finden sich regelmäßig Übersichten über die am Markt vertretenen Hersteller und ihre Systeme (PERSIDIS, 1998).

1.2.1 Miniaturisierung der Proben

Ein sich erhöhender Durchsatz an Proben ist nur möglich, wenn die zu handhabenden Volumina kleiner werden. Außerdem steht häufig wie z. B. bei Naturstoffextrakten nur sehr wenig Probenmaterial zur Verfügung.

Um Reaktionen parallel bearbeiten zu können, werden Mikrotiterplatten mit 96, 384 oder 1536 Vertiefungen („wells“) auf einer Grundfläche von 127×85 mm verwendet. Die 1536-Well-Platten mit einem Reaktionsvolumen von lediglich $2\text{--}8\ \mu\text{L}$ stellen bereits besondere Ansprüche an die Dosiereinheiten und das Problem der Evaporation tritt verstärkt in den Vordergrund. Die von EVOTEC BioSystems AG (Hamburg) entwickelten und eingesetzten Geräte sind z. B. in der Lage, einen einzigen Mikroliter in 3000 Einzeltropfen aufzuteilen (HENCO, 2000). Anstelle traditioneller Pipetten werden Piezotröpfchengeneratoren verwendet. Diese ermöglichen es auch, als nächsten Schritt Nanotiterplatten auf Siliziumtechnik zu verwenden, die pro Kavität nur noch Volumina von $10\text{--}500\ \text{nL}$ aufweisen.

Eine weitergehende Miniaturisierung ist möglich, indem die Reaktanden oder biologischen Katalysatoren direkt auf speziellen Oberflächen synthetisiert werden. In Analogie zu den hochvariablen Regionen von Antikörpern können dies Oligopeptide sein (BORREBAECK, 2000), im Falle von „DNA-Chips“ sind es bestimmte DNA-Muster (MELDRUM, 2000; WANG, 2000).

1.2.2 Analytik für HTS-Aufgaben

Je kleiner die Probenvolumina werden, desto sensativer muss die verwendete Analytik sein. Um positive Reaktionen erkennen zu können, werden die folgenden Methoden eingesetzt:

Farbbildung Während der Reaktion wird direkt ein Farbstoff gebildet bzw. entfärbt. Diese Methode ist sehr einfach, hat jedoch nur ein eingeschränktes Anwendungsgebiet.

Fluoreszenzmessung Ein gebildetes Molekül weist eine messbare Fluoreszenz auf, oder ein Fluorophor wurde gebunden. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern und in Gegenwart von Proteinen und anderen fluoreszierenden Komponenten messen zu können, werden Lantaniden-Fluorophore wie Europium verwendet. In Verbindung mit Chelaten tritt hier die Fluoreszenz nach der Anregung über einen Zeitraum von bis zu $730\ \mu\text{sec}$ auf. Durch diese „Time Resolved Fluorescence“ ist es möglich, die eigentliche Messung erst nach dem Abklingen der Hintergrundfluoreszenz durchzuführen (WEBB, 1998). Entsprechende Geräte und Methoden werden z. B. von den Firmen Wallac Oy (Turku, Finnland) und Agilent Technologies (Meriden, Connecticut) angeboten. Durch den hohen Innovationsdruck im Bereich der Pharmaindustrie ist es inzwischen möglich, Analyten mit optischen Methoden noch in Femtomolkonzentrationen nachzuweisen (BRECHT *et al.*, 1998). Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich gar mit der Beobachtung einzelner Moleküle und Bindungskomplexe durch die Kombination mehrerer fokussierter Laserstrahlen (SCHWILLE *et al.*, 1999).

HPLC und LC/MS Durch Miniaturisierung und Parallelisierung können auch nicht-optische Methoden für HTS-Aufgaben eingesetzt werden. Die Analysenzeiten können auch für

aufwändige Trennaufgaben in den Minutenbereich gesenkt werden (BATEMAN *et al.*, 2000; LAMOTTE & BISCHOFF, 2000).

Zunehmende Unterstützung finden alle HTS-Ansätze durch den Einsatz der Bioinformatik. Neben der Verarbeitung der anfallenden Datenmengen erkennen Programme methodische Fehler in Versuchsreihen und korrigieren die Resultate nachträglich (DOMEYER *et al.*, 2000). Mathematische Modelle beschreiben die Interaktion zwischen Molekülen und ermöglichen den Entwurf gezielterer Screening-Projekte.

1.2.3 Diversa-Strategie zur Enzymfindung

Phylogenetische Untersuchungen zeigen, dass der Anteil der bisher kultivierten Organismen bei unter 1 % liegt (STACKEBRANDT, 1998). Die 1994 gegründete Diversa Corp. (San Diego, Kalifornien) verlagert daher das Screening von der (Wirk-)stoffsuche auf die Ebene der Enzymisolierung. Ohne die Mikroorganismen in Kultur zu nehmen, wird DNA als Träger der Erbinformation direkt aus Umweltproben isoliert und automatisiert vollständig sequenziert. In den erhaltenen Sequenzen wird durch Vergleich mit Datenbanken nach bekannten Motiven gesucht und mögliche Enzyme gezielt exprimiert. Besonders extremophile Mikroorganismen sind von Interesse, und als erstes Unternehmen hat Diversa die wirtschaftliche Nutzung von Naturstandorten im Yellowstone Nationalpark, in Russland und in Südafrika in Form von „biotechnischen Schürfrechten“ aufgekauft (DIVERSA CORPORATION, 2000). Einen vergleichbaren Ansatz hat ein 1999 begonnenes Projekt der BASF AG (Ludwigshafen) und des Fraunhofer-Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (Stuttgart) (PARZICH, 1999).

Die Produkte komplizierter Stoffwechselwege können so jedoch u. U. nicht entdeckt werden, da diese intakte Zellen und damit lebende (Rein)kulturen erfordern. Es besteht daher weiterhin der Bedarf des Screenings vitaler ganzer Zellen – unter Akzeptanz der offensichtlichen Unkultivierbarkeit einer Vielzahl von Organismen.

1.3 Mikrobioreaktoren als Screening-Tool

1.3.1 Anreicherung – Isolierung – Selektion

Die Suche nach Organismen mit bestimmten Stoffwechselleistungen ist seit den Anfängen der Mikrobiologie eine ihrer Hauptaufgaben. Klassische Screeningansätze gliedern sich dabei in drei Schritte: In einer Anreicherungsphase werden die potenziell positiven Bakterien zunächst selektiv vermehrt. Im nachfolgenden Isolierungsschritt werden die angereicherten Organismen vereinzelt und in möglichst reiner Kultur entsprechend der Fragestellung als drittem Schritt untersucht und selektiert.

Zur Gewinnung von Reinkulturen bietet sich als eine Methode der Ausstrich auf ein verfestigtes Medium an. Aus Einzelzellen bilden sich separate Kolonien, und mithilfe von Bildauswertungs-Programmen und mechanisch bewegten Abimpfgeräten lassen sich diese Kolonien für weitere Untersuchungen z. B. in Mikrotiterplatten übertragen und näher untersuchen (FAVRE-BULLE *et al.*, 1998).

1.3.2 Einschluss von Zellen in Vollperlen

Eine alternative Methode wird 1994 in einer Patentanmeldung von Smithkline Beecham PLC (Brentford, Großbritannien) skizziert (MACMICHAEL *et al.*, 1994). Eine oder mehrere Zellen werden in der Hydrogelmatrix einer Vollperle eingeschlossen. Die Perlen haben die Funktion eines Mikrobioreaktors und bei Inkubation vermehren sich die Zellen in der Pore der Gelmatrix, in der sie eingeschlossen wurden. Allerdings ist die Position der entstehenden Kolonie innerhalb der Gesamtperle zufällig und die maximal mögliche Größe der Kolonie ist durch die Gelmatrix stark eingeschränkt.

Im Vergleich zum Ausplattieren bietet diese Methode jedoch trotzdem mehrere Vorteile:

- Aus den mikroskopisch kleinen Organismen werden makroskopisch handhabbare Partikel. Die Fermentation (Anreicherung) kann bei sehr geringem Platzbedarf für alle Perlen gleichzeitig in einem Fermenter erfolgen.
- Das Hydrogel der Perle stellt eine flüssigere Umgebung als die Oberfläche eines Festmediums dar und entspricht somit eher dem Habitat von Mikroorganismen. Besonders hinsichtlich der Faktoren Sauerstoffpartialdruck und Wasseraktivität ist zu erwarten, dass innerhalb der Perlen mehr Keime einer Probe lebensfähig sind als es auf einer Agaroberfläche der Fall wäre.
- Durch die Perle als Kompartiment sind bei nachfolgenden Untersuchungsschritten die Zellen einfacher von Lösungen abzutrennen; z. B. entfallen Zentrifugationsschritte.

Anwendung findet diese Idee in den Arbeiten zur Isolierung neuer Antimykotika oder Bakterizide. Zunächst werden hierfür Zellen in Alginatperlen (siehe auch Abschnitt 4.4.5 ab Seite 55) eingeschlossen und fermentiert. In einer einfachen Variante, wie sie von TerraGen Discovery Ltd. (Slough, Großbritannien) durchgeführt wird, werden diese Perlen anschließend auf einen wachsenden Rasen der entsprechenden Zielorganismen ausgelegt – eine Hofbildung um die Perlen dient als positives Entscheidungskriterium (CHARMAN & SARROUKH, 2000).

Intelligenter ist der Ansatz der ChromaXome Corp. (San Diego, Kalifornien), bei dem die zunächst gebildeten Perlen mit einer weiteren Schicht gecoatet werden. Diese weitere Hülle enthält die zu unterdrückenden Mikroorganismen, wodurch der Indikator direkt mit der Perle verbunden ist und das Auslegen auf einen Indikatorrasen entfällt. Die Beurteilung, ob eine Perle

eine trübe Hülle aufweist und die im Kern eingeschlossenen Zellen somit unwirksam sind, oder die Coating-Schicht klar geblieben ist, kann automatisch erfolgen (NASBY *et al.*, 1997).

1.3.3 Neue Strategie zum Konzept der Mikrobioreaktoren

Sowohl das Patent als auch die in der Literatur beschriebenen Anwendungen gehen ausschließlich von Vollkugeln aus. Im Falle von Alginat als Matrixmaterial wird hierzu ein mit Zellen versetzter Tropfen Natriumalginat in eine Calciumionenlösung gegeben, wo er vernetzt. Die Position der dadurch eingeschlossenen Zelle(n) innerhalb der gebildeten Perle ist jedoch zufällig und es kann sein, dass die sich aus der Zelle entwickelnde Kolonie dicht an der Oberfläche der Perle befindet. Diese Inhomogenität erschwert einerseits eine automatische Beurteilung der Trübung und vergrößert zudem die Gefahr, dass die Kolonie ausbricht, da die dünne verbleibende Membran dem Druck nicht mehr standhalten kann. Außerdem ist begründet durch das stark begrenzte, punktuelle Wachstum der Zellen nur eine relativ geringe biochemische Aktivität zu beobachten.

Im Gegensatz dazu sollen in dieser Arbeit Hohlkugeln untersucht werden (SPIEKERMANN *et al.*, 1987; KLEIN *et al.*, 1984). Wie in Abbildung 1.1 zu sehen ist, erfolgt die Hohlkugelbildung durch eine Gelierung „von innen nach außen“. Hierzu wird eine viskose Calciumchloridlösung in eine Natriumalginatlösung getropft. Durch die sich sofort bildende Membran von Calciumalginat können im Folgenden nur noch die Calciumionen nach außen diffundieren, wo sie weitere Alginatmoleküle vernetzen. Die Diffusion von Alginatmolekülen durch die Membran nach innen ist nicht möglich. So wächst um den flüssigen Kern eine feste Hülle aus Calciumalginat auf. Die Gelierung ist abgeschlossen, wenn das Reservoir an Calciumionen im weiterhin flüssigen Kern der Perle erschöpft ist.

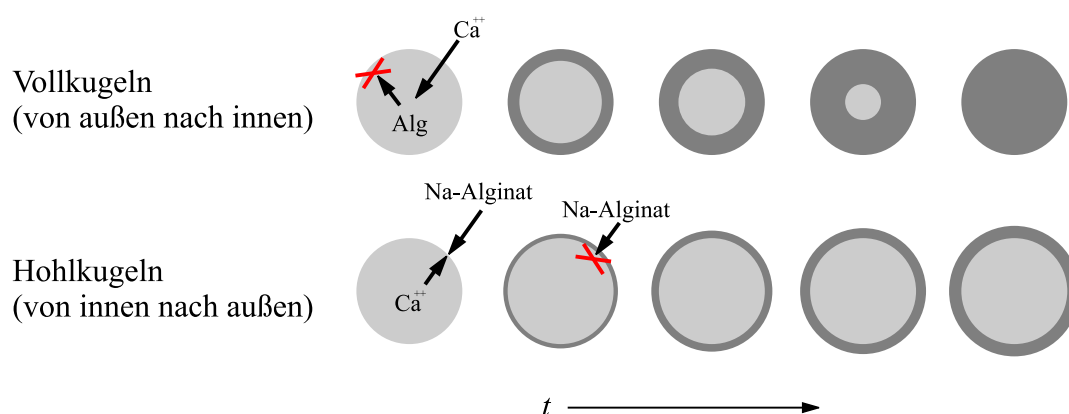


Abbildung 1.1: Bildung von Voll- und Hohlkugeln durch unterschiedliche Gelierungsrichtungen.

Dieses neue Konzept bietet deutliche Vorteile gegenüber den in Abschnitt 1.3.2 beschriebenen Vollperlen:

- Da sich die eingeschlossenen Zellen im flüssigen Kern befinden, sind sie keinen direkten Matrixeinflüssen wie Belegung der Oberfläche mit Alginatmolekülen oder Gegendruck bei Koloniebildung ausgesetzt.
- Die den Kern umgebende Hülle ist an jeder Stelle gleich stark und aufgrund des Herstellungsweges absolut zellfrei. Das Ausbrechen bzw. Auswachsen der Zellen ist somit unmöglich.
- Das gesamte flüssige Innenvolumen steht den Zellen zum Wachstum zur Verfügung. Hierdurch kann ein Vielfaches mehr an Zellen wachsen als im Fall der in einer Pore eingeschlossenen Kolonie, sodass mehr Produkt für die nachfolgende Analytik zur Verfügung steht und diese erleichtert wird.

Im Gegensatz zur Patentschrift sollte pro Kugel außerdem statistisch deutlich weniger als eine lebensfähige Zelle eingeschlossen werden. Hierdurch treten viele unbeimpfte Hohlkugeln auf, die getrübt und damit bewachsenen Mikrobioreaktoren jedoch beinhalten jeweils nur die Klonen einer einzigen Zelle und keine Mischkulturen. Reinkulturuntersuchungen werden möglich.

1.4 Aufgabenstellung

Basierend auf dem neuen Konzept der Hohlkugeln als Mikrobioreaktoren sollten folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- Auswahl von geeigneten Komponenten bzw. Anpassung und Erweiterung kommerziell erhältlicher Bauteile, um das Screening auf Basis von Hohlkugel-Immobilisaten zu automatisieren.
- Entwicklung einer Software-Umgebung, die die einzelnen Arbeitsschritte dieses Screening-Automaten steuert und die anfallenden Daten aufbereitet.
- Herstellung von Hohlkugeln, die für die Immobilisierung von (Einzel)zellen geeigneten sind.
- Durchführung eines Beispiel-Screenings zur Demonstration der Funktionsfähigkeit der einzelnen Teile des entwickelten Automaten.

Kapitel 2

Aufbau des Screening-Automaten

2.1 Vorüberlegungen

2.1.1 Konzept des geplanten Screening-Automaten

Das Fließbild in Abbildung 2.1 gibt die Umsetzung der Screening-Strategie auf Basis von in Hohlkugeln immobilisierten (Einzel)zellen wieder. Von der zu untersuchenden Probe wird die Anzahl der unter den gewählten Selektionsbedingungen lebensfähigen Keime abgeschätzt. Die Probe kann die Suspension einer Bodenprobe aus der Umwelt sein, es kann aber auch eine mit klassischen Methoden mutierte Kultur sein. Im ersten Fall sind eine Vielzahl der später untersuchten Organismen Klone des gleichen Bakteriums, in der zweiten Kultur liegen bei ausreichend aggressiven Mutationsbedingungen hauptsächlich Zellen unterschiedlichen Erbgutes vor.

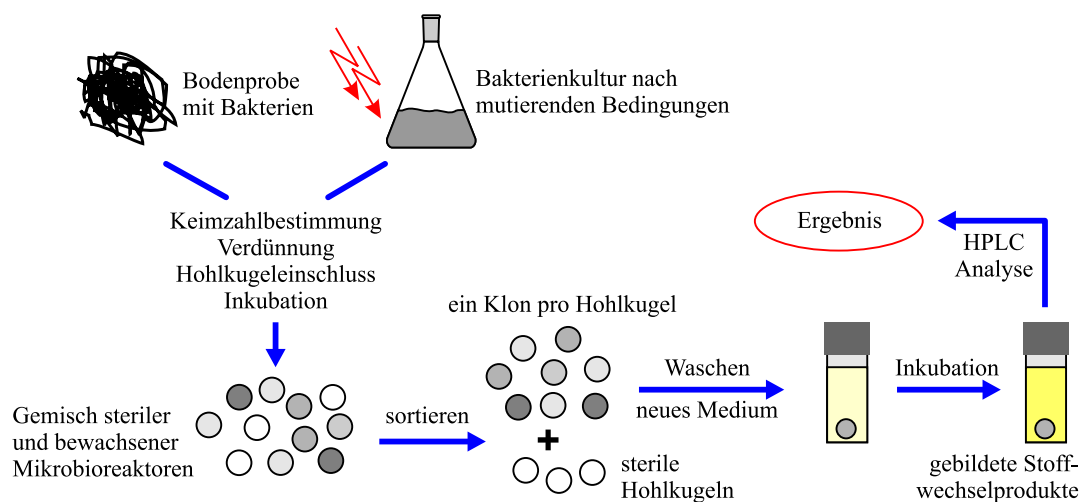


Abbildung 2.1: Fließbild zum Screening-Ansatz auf Basis von Hohlkugeln als Mikrobioreaktoren.

Entsprechend dem Ergebnis der Keimzahlbestimmung wird die Probe verdünnt und Hohlkugeln hergestellt und unter den gewünschten Bedingungen inkubiert. Diese Inkubation kann in einem

einziges Kulturgefäß erfolgen. Es ist jedoch zu verhindern, dass sich ein Teil der Zellen aus Stoffwechselprodukten anderer Zellen ernährt, was der Bedingung eines selektiven Wachstums widerspricht. Abhängig von der Aktivität der Zellen und der Abbaubarkeit des untersuchten Produktes ist daher ggf. mehrfach bzw. kontinuierlich das Medium zu wechseln.

Nach der Inkubation werden die Perlen optisch begutachtet und aufgrund einer Trübungsmessung die bewachsenen von den sterilen und damit klaren Perlen getrennt. Sollte sich die gesuchte Stoffwechselleistung direkt durch eine photometrische Untersuchung nachweisen lassen, könnte diese ebenfalls an diesem Verfahrensschritt erfolgen. In diesem Falle wäre das Screening beendet. Auf diesem Prinzip beruht der bereits in Abschnitt 1.3.2 beschriebene Ansatz der ChromaXome Corp. zum Auffinden von Antibiotika.

Wenn sich die gesuchte Reaktion nicht direkt optisch sondern z. B. nur über chromatographische Methoden wie HPLC nachweisen lässt, müssen die bewachsenen Perlen näher untersucht werden. Diese Untersuchung kann nicht direkt nach der Fermentation erfolgen, da es sich bei den gesuchten Verbindungen zumeist um Moleküle mit relativ geringer Molmasse handelt, die im Gegensatz zu den Zellen durch die Matrixhülle nicht zurückgehalten werden. Innerhalb der vielleicht nur einen Hohlkugel, die die produzierenden Organismen einschließt, reichern sich diese Stoffe daher nicht an, sondern sie sind gleichmäßig im gesamten Fermentationsvolumen und damit auch in allen anderen Hohlkugeln verteilt.

Diese Überlegung gilt auch für den Großteil der extrazellulären Enzyme, da diese oftmals für eine Rückhaltung durch die Hohlkugelmembran zu klein sind. Ihre Aktivität ist nicht auf das Volumen der Hohlkugel beschränkt und eine sofortige Untersuchung der Mikrobioreaktoren würde auch hier falsche Resultate erbringen.

Die bewachsenen Perlen müssen daher gewaschen und in neuem Medium einzeln inkubiert werden, damit sich ausreichend Analyt anreichern kann. Erst dann kann eine Probe entweder direkt aus dem Inneren der Hohlkugel oder aber aus dem umgebenden Medium, sofern es in einem angemessenen Volumenverhältnis steht, entnommen und analysiert werden.

Bei einem positivem Analysenergebnis befinden sich die Zellen, die die gewünschte biochemische Reaktion katalysieren, innerhalb der Hohlkugel, deren Probe untersucht wurde. Durch eine schonende Auflösung der Hohlkugelmembran werden die gesuchten Zellen freigesetzt und stehen für weitere Arbeiten zur Verfügung.

2.1.2 Festlegung des Programmablaufplanes

Die eigentliche Herstellung der Hohlkugeln sowie ihre primäre, gemeinschaftliche Inkubation sollten separat erfolgen. Sie waren nicht als Bestandteil des Automaten geplant, für den sich damit der in Abbildung 2.2 aufgeführte Programmablaufplan ergibt. Die weitere Unterteilung der einzelnen Schritte und ihre technische Umsetzung sind detailliert in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

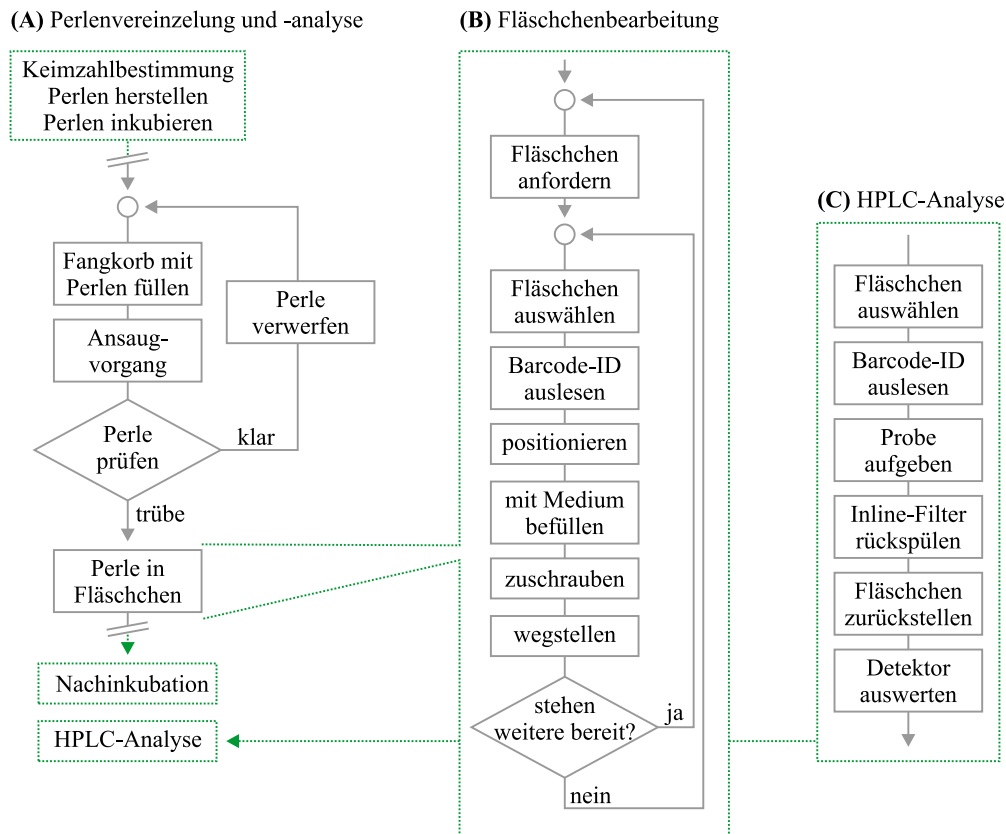


Abbildung 2.2: Programmablaufplan des Screening-Automaten; mit „Fläschchen“ sind die Gefäße zur Aufnahme der Mikrobioreaktoren bezeichnet.

2.1.3 Festlegung der wesentlichen Parameter

Der Programmablaufplan verdeutlicht, dass es drei Arbeitssäulen gibt, die parallel ablaufen sollten und sich teilweise gegenseitig beeinflussen:

- Pipettieren von Flüssigkeiten und Hohlkugeln (Mikrobioreaktoren)
- Transport und Handhabung von Fläschchen
- HPLC-Analyse der nachinkubierten Mikrobioreaktoren

Die gleichzeitige Bewegung von Flüssigkeit bzw. Perlen und Fläschchen erfordert ein zwei-armiges Zentralmodul. Der Arbeitstakt innerhalb des Systemes soll von der Pipettier- sowie HPLC-Analysen-Säule vorgegeben werden. Der Transportarm für Fläschchen war so auszu-legen, dass die beiden anderen Säulen auf ihn als Dienstleistungskomponente zurückgreifen können. Diese Verflechtung war in der räumlichen Anordnung und der Auslegung der Steuerung zu berücksichtigen.

Bei der Dimensionierung wurde von einem Durchmesser für die Mikrobioreaktoren von maximal 4 mm ausgegangen. Als Gefäße für die erforderliche Nachinkubation waren somit 1,5-mL-HPLC-Fläschchen („Vials“) verwendbar. Über einen Barcode sollten die Vials eindeutig

geennzeichnet werden; auf einem Halter („Tray“) sollten jeweils 24 Fläschchen Platz finden. Eine Vorrichtung zur Bewegung dieser Trays sollte gleichermaßen auch mit den bereits angesprochenen 96-Loch-Platten arbeiten können. Die Mikrotiterplatten wurden hier berücksichtigt, um darin z. B. Verdünnungen anfertigen zu können, sollte dies erforderlich sein.

2.2 Beschreibung der Hardware

2.2.1 Grundsätzlicher Aufbau

Die räumliche Anordnung der Hardware, die sich aus den drei Arbeitssäulen ableitet, ist in Abbildung 2.3 in der Aufsicht dargestellt. Ebenfalls eingezeichnet sind ein Verfahrensschlitten für Vial-Trays bzw. Mikrotiterplatten, eine Vorrichtung zur Vereinzelung der Perlen, diverse Vorlagegefäße und eine Identifizierungsstation für Vials. In der Peripherie sind Versorgungsstationen, Inkubationsmöglichkeiten und die nachgeschaltete Analytik untergebracht. Wie aus der Abbildung hervorgeht und in Kapitel 3 ab Seite 35 ausgeführt ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht alle dieser peripheren Erweiterungen realisiert.

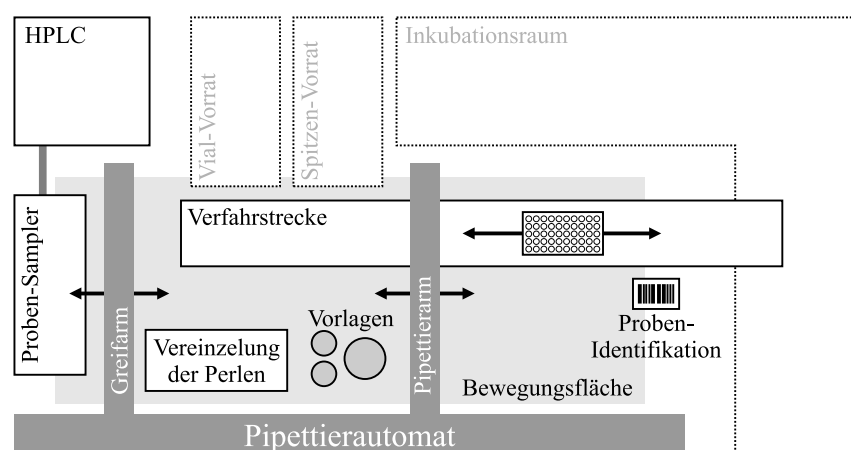


Abbildung 2.3: Aufsichtzeichnung des geplanten Screening-Automaten; in matt dargestellt die im Rahmen dieser Arbeit nicht realisierten Einheiten.

2.2.2 Rechnerplattform und zentrale Pipettiereinheit

Durch das zur Verfügung stehende HPLC-System der Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg) und die damit verbundene Chromatographie-Software **Class VP** war als Entwicklungsumgebung eine PC-Plattform mit Windows NT 4.0 als Betriebssystem vorgegeben.

An das auszuwählende Zentralgerät wurden die folgenden Anforderungen gestellt:

- zwei bewegliche, voneinander unabhängige Arme (Pipettier- und Transportaufgaben)

- ein System, das ausreichend „offen“ ist für Erweiterungen
- Ansteuerung aller Funktionen über eine genormte Schnittstelle zu dem PC-Rechner und Offenlegung des Kommunikations-Protokolls
- ein akzeptabler Kostenrahmen

Als einziges am Markt verfügbares Gerät entsprach das OEM-Produkt RSP9652 der Cavo Scientific Instruments Inc. (Sunnyvale, Kalifornien) allen diesen Punkten (CAVRO, 1996). Es wird z. B. in den Pipettierautomaten der TECAN Group AG (Hornbrechtikon, Schweiz) verwendet. Zwei Arme mit einer Gesamt-Bewegungsfläche von 780×300 mm und einem Hub von 175 mm können unabhängig voneinander angesteuert werden. Die Kommunikation erfolgt über ein umfangreiches Protokoll über eine RS232-Schnittstelle („serielle Schnittstelle“).

2.2.3 Ansteuerung von Relais und Schrittmotoren

Nicht alle benötigten Bewegungsgeber konnten im Rahmen des zur Verfügung stehenden Budgets als fertige Komponenten bezogen werden. Diese hätten den Vorteil gehabt, vergleichbar zu dem RSP9652 über die genormte RS232-Schnittstelle programmierbar zu sein. Stattdessen wurden sie wie weiter unten im Einzelnen beschrieben auf Basis von handelsüblichen druckluftbetriebenen Zylindern oder Greifern bzw. mit einfachen Getriebe-schrittmotoren (AMA 122-D1s-Z1, Starpoint Electrics Ltd., Morden, Großbritannien) ausgeführt.

Die Ansteuerung dieser Einheiten von der vorgegebenen PC-Plattform und die Aufnahme von Rückmeldungen erfolgte über eine Messwerterfassungskarte (PCL-812PG, Advantech Co. Ltd., Shin Tien City, Taiwan). Da die 16 Ausgangskanäle der Karte hierfür nicht ausreichend waren und außerdem der zur Verfügung stehende TTL-Signalpegel zu leistungsschwach ist, war zunächst eine Adapterschaltung zu entwickeln.

Diese Schaltung besteht aus zwei Teilen: Einer galvanischen Trennung und Signalverstärkung (Optokoppler-Platine) und mehreren identischen Platinen für die eigentliche Ausgabe (Relais-Platinen). Von den 16 zur Verfügung stehenden Ausgangskanälen werden acht Kanäle für die Ausgabedaten verwendet (Datenbyte), die weiteren acht fungieren als Steuerleitungen (Steuerbyte). Sie bestimmen, welche der bis zu acht auf dem Datenbus hintereinander liegenden Relais-Platinen die aktuell anliegenden Daten übernehmen soll. Schalt- und Bestückungspläne finden sich im Anhang auf Seite 98, die folgenden Absätze beschreiben die Funktionsweise in der Übersicht.

Optokoppler-Platine

Herzstück dieser Platine sind 16 Optokoppler der PC817-Serie (Sharp Corp., Japan) zur galvanischen Trennung der Leitungen aus der NT-Workstation und den nachgeschalteten Bauteilen. Um ausreichend Leistung für die Optokoppler zu haben, wird das Signal der PCL-812PG-Karte zunächst über SN74LS51-Schottky-Bausteine (Motorola Inc., Rolling Meadows, Illinois)

und „pull-up-Widerstände“ ($330\,\Omega$) verstärkt. Als Spannungsquelle dient die ebenfalls von der PC-Karte bereitgestellte 5-V-Versorgung. Die Ausgänge der Optokoppler schalten den von der sekundären Versorgung über $1\text{-k}\Omega$ -Widerstände gelieferten Strom auf Masse. Sperren die Optokoppler, so steht diese Leistung über weitere SN74L51-Schottkys für die nachgeschalteten Bauteile als positives Signal bereit.

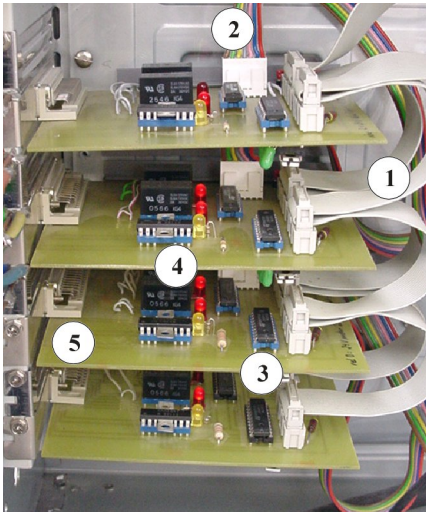
Relais-Platine(n)

Bei der Auslegung der Relais-Platinen stand die Möglichkeit ihrer universellen Benutzung im Rahmen des Screening-Automaten im Vordergrund. Die Verbindung zu einem selbstgebauten Hardware-Teil, wie z. B. der Verfahrstrecke zur Bewegung von Vial-Trays, sollte über jeweils eine Platine erfolgen. Diese musste also sowohl für die anfallenden Schaltvorgänge als auch für Kontakt-Rückmeldungen („digital-IN“ der PCL812-PG-Karte) ausgelegt sein. Dies wurde möglich, indem pro Platine zwei Relais-Bausteine, ein Steuerbaustein für die verwendeten Schrittmotoren, Kontakte für bis zu vier digitale Eingangs-Signale und Spannungsanschlüsse für 6, 12 und 24 V untergebracht wurden.

Ein MC4HCT573A-Speicherbaustein (Motorola Inc.) ermöglicht es, dass alle Platinen über das gleiche Datenbyte gesteuert werden können. Der Baustein übernimmt die an den Eingängen anliegenden Daten nur dann, wenn an Pin 1 („latch enable“) ein Signal anliegt. Dieses Signal entstammt dem Steuerbyte. Der für die jeweilige Karte maßgebliche Kanal, also ihre Adresse, wird durch eine variable Lötbrücke bestimmt.

Die beiden ersten Datenbits steuern über einen ULN2803-Darlington-Baustein (Motorola Inc.) je ein Relais (G5V 2 A, Omron Corp., Tokyo, Japan), das dritte Bit initialisiert den Schrittmotor-Treiberbaustein SAA1042 (Motorola Inc.). Hierfür ist ebenfalls das Darlington-IC notwendig. Datenbits sechs bis acht geben in direkter Verbindung vom Speicherbaustein den Takt, die Drehrichtung und die Schrittweite für den SAA1042 und damit den Schrittmotor an. Die Relais-Karte wird vervollständigt durch zwei Dioden, um den Abschaltstrom der Relais zu unterdrücken, und drei Leuchtdioden mit Vorwiderstand, die Relais-Zustände und Takt des Schrittmotors visualisieren.

Die gesamte Schaltung ist einseitig auf einer Europlatine untergebracht, die einzelnen Platinen sind, wie in Abbildung 2.4 zu sehen, in ein Standard-Computergehäuse montiert, das auch die Stromversorgung bereitstellt. Über zwei Bus-Flachbandleitungen ① werden Daten- bzw. Adressbyte von der Optokoppler-Platine und Kontakt-Rückmeldungen übermittelt. Die Weiterleitung der Informationen von und zu der nachfolgenden Hardware erfolgt über 25-polige SUB-D-Buchsen ⑤. Durch individuelle Lötbrücken können die Anzahl und Adressen der Rückmeldungsleitungen bestimmt werden. Weiterhin legen diese Brücken fest, welche Spannungen (6, 12 oder 24 V) von den Relais ④ geschaltet werden und ob es sich um öffnende und/oder schließende Schaltvorgänge handelt.

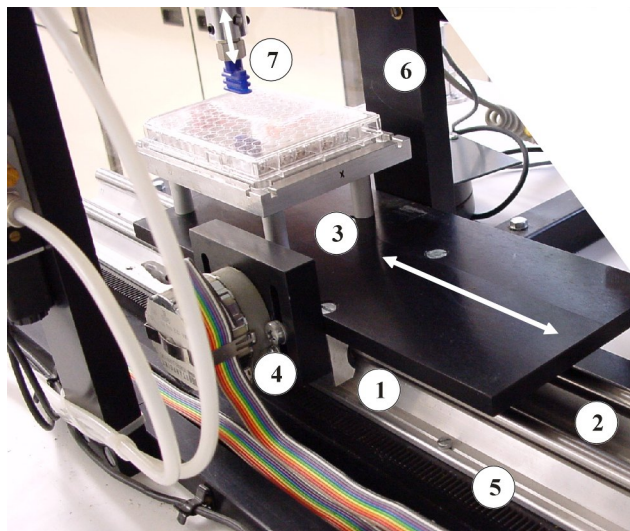


- ① Bus-Flachbandleitungen (Input und Output)
- ② Leitungen für die Spannungsversorgung
- ③ Steuerbausteine
- ④ Schrittmotortreiber, Schaltrelais und Kontroll-LEDs
- ⑤ 25-polige SUB-D-Buchse als Schnittstelle

Abbildung 2.4: Abbildung der in ein Standard-Computergehäuse montierten Relais-Platinen.

2.2.4 Bewegung der Vial-Trays und Mikrotiterplatten

Auf den Schlittenblock ① einer Linearführung (② Länge 900 mm) wurde, wie in Abbildung 2.5 dargestellt eine Platte mit vier angespitzten Stiften ③ montiert. Passend zu diesen Stiften wurden selbstpositionierende Adapter gleicher Grundflächen für die Aufnahme von Mikrotiterplatten bzw. mit 6×4 Bohrungen für Vials hergestellt. Seitlich am Schlittenblock wurde ein Schrittmotor mit Zahnrad ④ angebracht, der über eine feststehende Zahnstange ⑤ eine Fahrbewegung ermöglicht.



- ① Schlittenblock
- ② Linearführung
- ③ Trägerstifte
- ④ Schrittmotor mit Zahnrad
- ⑤ Zahnstange
- ⑥ Portal mit Pneumatikzylinder
- ⑦ Saugnapf zum Deckelheben

Abbildung 2.5: Abbildung der Verfahrstrecke und des Portals zum Deckelheben.

Unter dem Portal ⑥ können Abdeckungen von Mikrotiterplatten mittels eines Venturi-Vakuumgebers (Vent-2a, Sommer-automatic GmbH & Co. KG, Straubenhardt) und eines per Druckluftzylinder (PZ 32 50D) heb- und senkbaren Saugnapfes (⑦ SFO8/25SI) abgehoben werden. Hierdurch entfällt die manuelle Öffnung, und das Risiko einer Kontamination wird gesenkt.

2.2.5 Pipettiervorgänge und Vial-Transport

Zum exakten Pipettieren von Flüssigkeiten wurde ein Arm des RSP9652 wie in Abbildung 2.6 dargestellt mit einer sogenannten DiTiC-Option bestückt. Mittels eines Metallkonus ① können Einwegplastikspitzen („tips“) durch eine Abwärtsbewegung in die feststehende Spitze aufgenommen und über eine eingebaute Abwurfvorrichtung ② durch völliges Hochfahren auch wieder gelöst werden. Die Spitzen haben Maximalvolumina von 200 bzw. 1000 μL . Sind sie aus einem leitfähigen Material, so kann das Gerät detektieren, wenn mit der Spitze eine Flüssigkeitsoberfläche berührt wird. Dies ermöglicht auch bei Gefäßen mit wechselnder Inhaltsmenge identische Pipettiervorgänge. Das Aufsaugen und Abgeben von Flüssigkeit erfolgt über eine angeschlossene Kolbenspritze (XP3000, Cavo Scientific Instruments Inc., Sunnyvale, Kalifornien), die ebenfalls über eine RS232-Schnittstelle verfügt.

An dem zweiten Arm ist über einen maßgefertigten Adapter aus Plexiglas ④ ein Pneumatikgreifer ⑤ GP12 angebracht, der durch ein 24-V-Druckluftventil geöffnet bzw. geschlossen wird. Für die beiden Backen des Greifers wurden halbkreisförmige Verlängerungen ⑥ entworfen, die für das Greifen von offenen und zugeschraubten Vials bzw. Vial-Deckeln ⑦ ausgelegt sind.

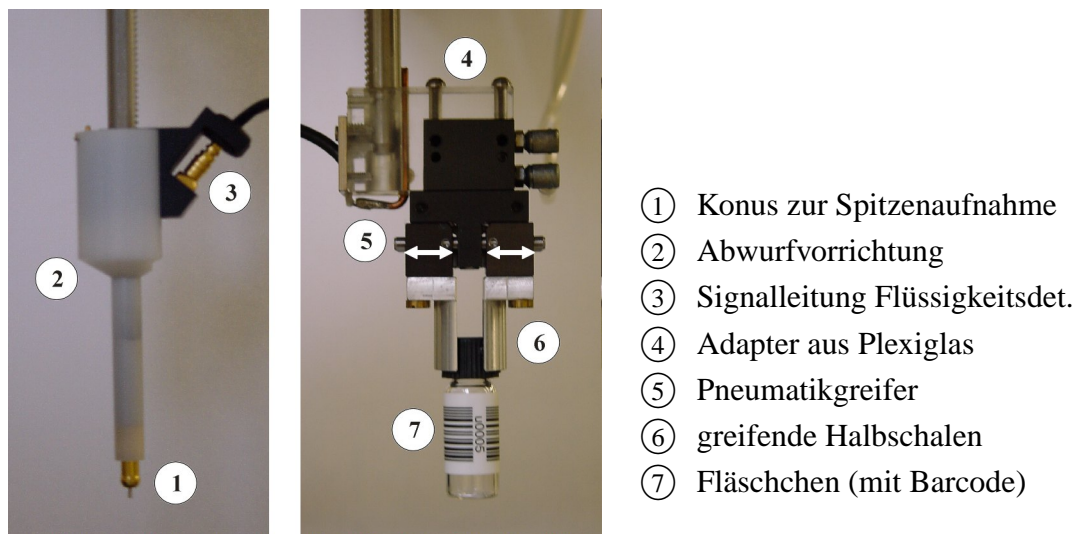


Abbildung 2.6: Pipettier- und Greifarm am RSP9652.

2.2.6 Vereinzelung von Hohlkugeln und visuelle Bewertung

Die Hohlkugeln werden nach der ersten Inkubation in ein flaches Glasgefäß (Durchmesser 150 mm, Höhe 100 mm) gegeben, das abgesehen von einer aufgesetzten Rohrröhröffnung ① völlig geschlossen ist, wie in Abbildung 2.7 in der Aufsicht zu erkennen ist. Die in dem Glasgefäß befindliche Flüssigkeit wird über einen Magnetrührkern bewegt, sodass die Hohlkugeln in ständiger Bewegung sind und sich nicht am Boden absetzen.

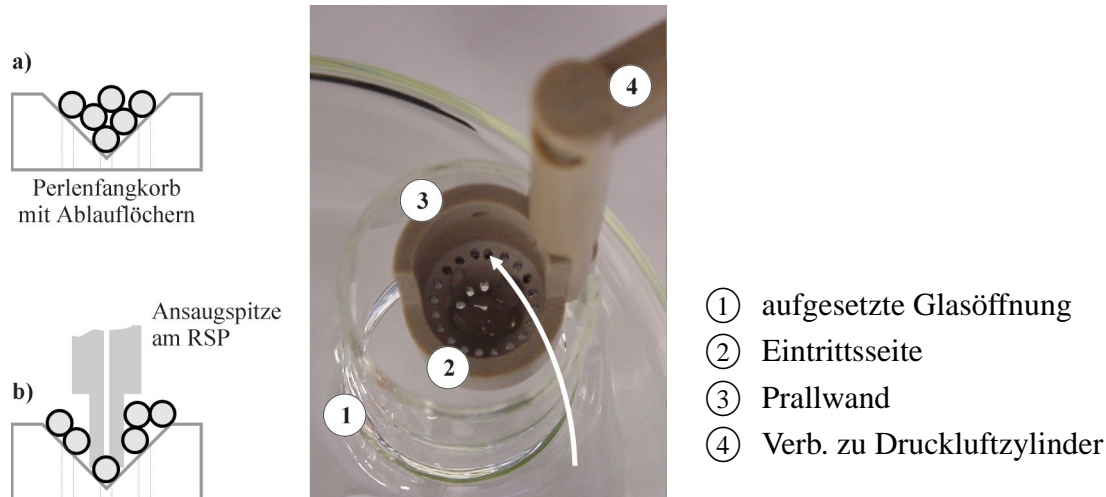


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Ansaugvorganges für eine Perle (links) und Abbildung des Fangkorbes (rechts).

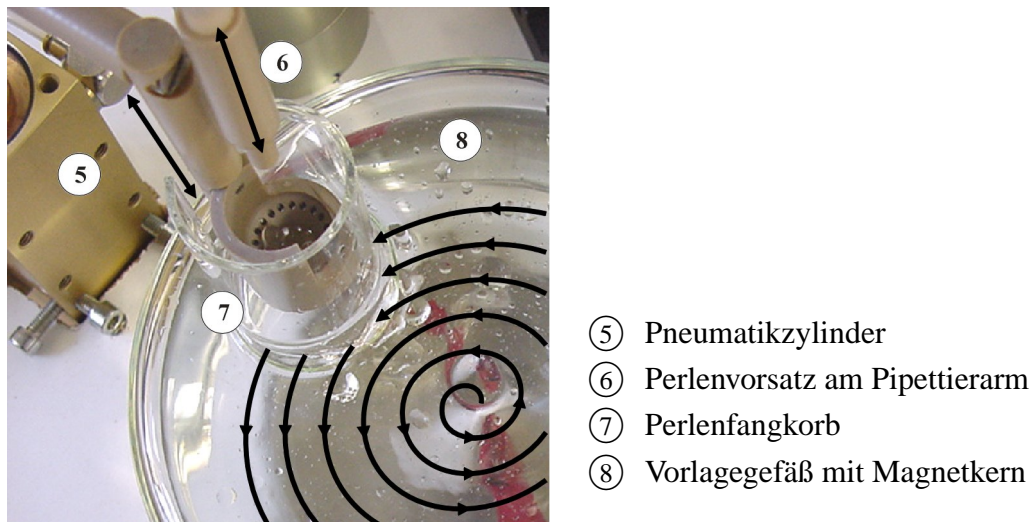


Abbildung 2.8: Vorlagegefäß für die zu vereinzelnden Perlen und Fangkorb in der Übersicht.

Durch diese Rohröffnung kann ein Fangkorb in die Flüssigkeit getaucht werden, der nach Maßzeichnung aus dem Werkstoff Polyethyletherketon (PEEK) gefertigt wurde. Auf der angeströmten Seite ② ist der Korb seitlich offen, auf der anderen Seite befindet sich eine Prallwand ③, die dazu führt, dass sich Perlen auf dem mit Ablauflöchern versehenen Boden sammeln. Beim Anheben des Fangkorbes über den Verbindungsarm ④ und einen zugehörigen Druckzylinder ⑤ läuft die enthaltene Flüssigkeit nach unten ab und die Perlen werden sichtbar.

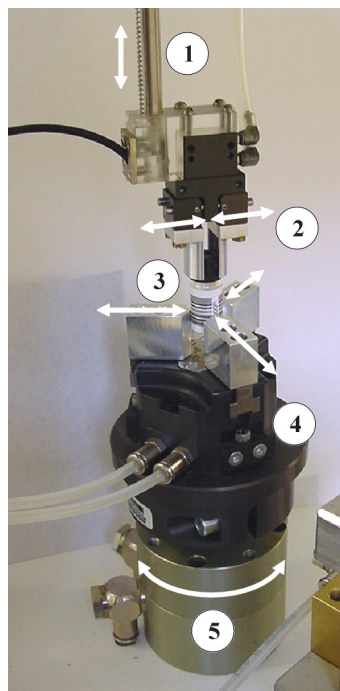
Mittels eines für das Ansaugen von Perlen angefertigten Aufsatzes (⑥ Werkstoff ebenfalls PEEK) für die DiTiC-Option des Pipettierarmes kann die im Zentrum des Fangkorbes liegende Perle angesaugt werden. Durch die konische Form des Fangkorbes wird auch dann eine Perle angesaugt, wenn sich mehrere Perlen im Fangkorb befinden, da überzählige Perlen sanft zur Seite gedrückt werden.

Die Perle wird dann zur Entscheidung, ob sie bewachsen (getrübt) oder steril (klar) ist, unter einer CCD-Kamera (CD-14, DBS GmbH, Bremen) abgelegt. Die CCD-Kamera wird über RS232-Schnittstelle (Vergrößerungsfunktion, Schärfeneinstellung, Farbabgleich) angesteuert, ihr Signal wird über eine Framegrabber-Karte (DFG/LC1, DBS GmbH) in die NT-Workstation übertragen. Die CCD-Kamera kann neben der Begutachtung von Perlen außerdem für die Dokumentation und Auswertung inkubierter Mikrotiterplatten eingesetzt werden.

Sollte sich in dem Fangkorb keine einzige Perle befinden, so wird dies beim Ansaugen selber noch nicht bemerkt, da keine Kontrolle des eigentlich ansteigenden Unterdruckes erfolgt. Bei der nachfolgenden visuellen Kontrolle wird dieser „Fehler“ jedoch erkannt. Es kommt also in diesem Fall zu keinem Fehlverhalten, lediglich die Bearbeitungszeit des Automaten verlängert sich.

2.2.7 Öffnen und Schließen von Vials

Bei den verwendeten 1,5-mL-Vials verschließt eine mit Septum versehene Plastikkappe per Schraubgewinde die Glasfläschchen. Die mechanische Stabilität des RSP-Armes (①) und des Greifers (②) siehe auch Abschnitt 2.2.5) ist ausreichend hoch, um wie in Abbildung 2.9 wiedergegebenen als Stator bei einer entsprechenden Schraubbewegung zu dienen. Zur Drehbewegung wird das Glasfläschchen (③) von einem druckluftbetriebenen 3-Finger-Greifer (④ GD304) gefasst, der von einem pneumatischen Drehzylinder (⑤ PRN30SE-90-45) um 90° gedreht werden kann. Durch eine Wiederholung der Bewegungsfolge Greifen-Drehen-Lösen-Zurückdrehen können Vials zu- und bei Bedarf auch wieder aufgeschraubt werden.



- ① Zahnstange des RSP9652-Greiferarmes
- ② Pneumatikgreifer mit Rundbacken
- ③ mit Barcode-Etikette beschriftetes Vial
- ④ pneumatischer 3-Finger-Greifer
- ⑤ pneumatischer Drehzylinder

Abbildung 2.9: Einheit zum Zuschrauben von Vials, hier gezeigt mit eingeführtem Vial.

2.2.8 Beschriftung und Identifizierung der Proben

Um die für die Nachinkubation der Hohlkugeln verwendeten Vials eindeutig identifizieren zu können, wurde ein Barcode-System und Beschriftung mit arabischen Zahlen gewählt. Die Barcodes sollten auf die Vials aufklebbar und unabhängig vom Drehwinkel lesbar sein. Dies war mit einer „Leiteranordnung“ auf einem rundherum geklebtem Etikett möglich. Die Code-Striche werden lediglich von einer Ziffern-Wiedergabe des Codes unterbrochen.

Um auch bei aufgeklebtem Etikett den Inhalt des Vials erkennen zu können, darf die Glasfläche nicht vollständig beklebt werden. Gleichzeitig müssen die Etiketten eine Heißdampf-Sterilisation überstehen, da die Vials vor der Befüllung mit Medium sterilisiert werden. Nach Vorversuchen verschiedener Materialien, Barcode-Typen und Scannern wurde die in Tabelle 2.1 aufgelistete Kombination als geeignet ausgewählt; ein beklebtes Fläschchen war bereits in Abbildung 2.6 auf Seite 15 dargestellt.

Tabelle 2.1: Daten zu den Barcode-Etiketten für die Beschriftung von Vials.

Barcode-Typ	Interleaved 2/5 0,3 mm, W/N Ratio 2,1:1, vier Ziffern
Material	Polymaster matt, im Photosatzverfahren beschriftet, 35 x 17 mm
Kleber	Acrylatkleber IB 0,06 mm, Temperaturbereich -60 bis 120 °C
Lieferant	INOTEC Barcode Security GmbH (Neumünster)
Scanner	ST 3701 CCD-Einbaugerät (Welch Allyn Inc., Skaneateles Falls, New York)
Eigenschaften	RS232-Schnittstelle, 660 nm LEDs, 1,5 bis 8 cm Lesedistanz

2.2.9 HPLC-Analyse nach der Nachinkubation

Obwohl die Zellen innerhalb der Hohlkugeln angezogen werden, ist nicht garantiert, dass der Überstand über diesen Hohlkugeln innerhalb der Vials völlig zell- und partikelfrei ist. Deshalb müssen die Proben vor der Aufgabe auf die Trennsäule durch einen Inline-Filter geführt werden.

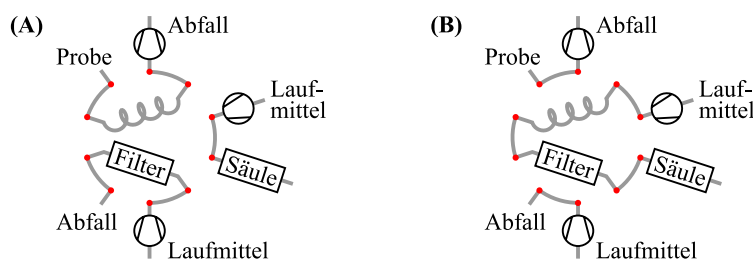


Abbildung 2.10: Darstellung der Stellungen am HPLC-Schaltventil für (A) Befüllung der Probenschleife und Rückspülung des Inline-Filters und (B) Aufgabe der Probe auf die Säule.

Um diesen Filter nach jeder aufgegebenen Probe durch rückwärtiges Spülen wieder reinigen zu können, wurde wie in Abbildung 2.11 gezeigt ein HPLC-Schaltventil mit 10 Anschlüssen

- | | |
|--------------------------------------|---|
| ① HPLC-Schaltventil | ④ Verfahrsschlitten für Vials |
| ② XP3000 Kolbenpumpen | ⑤ Schrittmotor für horizontale Bewegung |
| ③ Flaschen für Laufmittel und Abfall | |

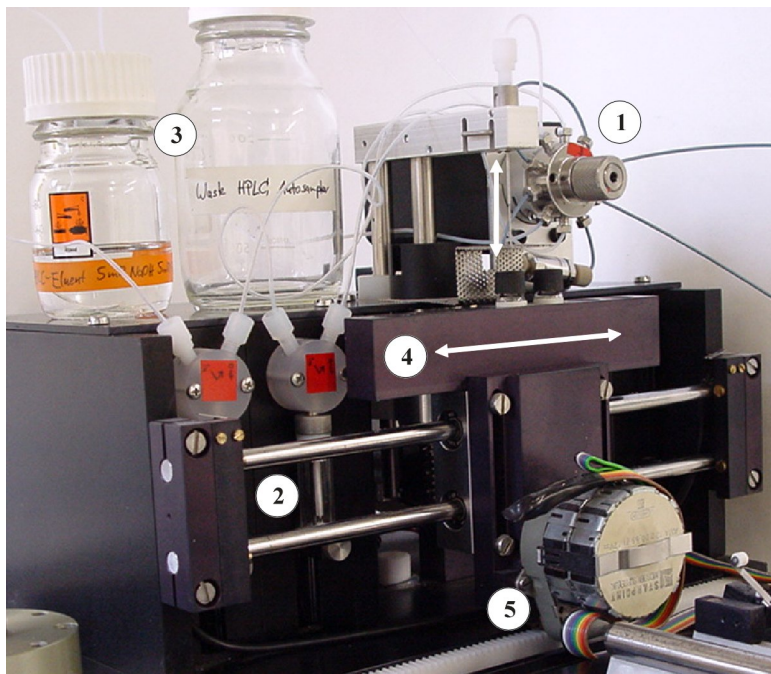


Abbildung 2.11: Abbildung des vollständigen Probensamplers.

eingesetzt (① Vici 10-Port Typ W, Valco Instruments Inc., Houston, Texas). Gesteuert wird dieses wie die beiden Kolbenpumpen (② XP3000, Cavo Scientific Instruments Inc., Sunnyvale, Kalifornien) für Probendosierung bzw. Rückspülung des Filters über RS232-Signale.

Die Schaltung der an das Ventil angeschlossenen Pumpen, des Filters und der Säule ist in Abbildung 2.10 für die Stellung der Probenschleifenfüllung bzw. Rückspülung des Inline-Filters (A) und die Stellung der Probenaufnahme auf die Säule (B) dargestellt.

Zur horizontalen Bewegung der Vials wurde eine Linearführung (Länge 300 mm) ausgewählt, die über Schrittmotor mit Zahnrad und feststehender Zahnstange ⑤ bewegt wird. Auf den Schlittenblock der Linearführung ist ein Träger ④ montiert, der mehrere Vials nebeneinander aufnehmen kann.

Für die Probenentnahme aus den Vials wird eine Nadel durch das Septum eingestochen. Die Nadel einschließlich Arm und die Bestandteile für die Umsetzung der Motordrehung (24-V-Motor 2140.937-22.112-050 mit 200:1 Getriebe, Maxon Motor GmbH, München) in die benötigte vertikale Bewegung wurden als halbfertiger Bausatz bezogen. Es handelt sich im Einzelnen um das „Needle arm assembly 816“, eine Zahnstange incl. Führung und ein passendes Zahnrad aus dem Autosampler Basic Marathon (Spark Holland Instrumenten, Emmen, Niederlande).

Für die eigentliche HPLC-Analyse wird das im Anhang auf Seite 105 beschriebene Chromato-

graphie-System der Shimadzu Deutschland GmbH verwendet.

2.2.10 Zusammenführung der Hardwarekomponenten

Die Übersichtsabbildung 2.12 zeigt das Zusammenspiel der Hardwarebauteile und den Informationsfluss zwischen den einzelnen Komponenten. Die technische Umsetzung entsprechend der in Abschnitt 2.2.1 diskutierten Anordnung zeigt Abbildung 2.13, in der lediglich die angeschlossene HPLC-Einheit nicht wiedergegeben ist.

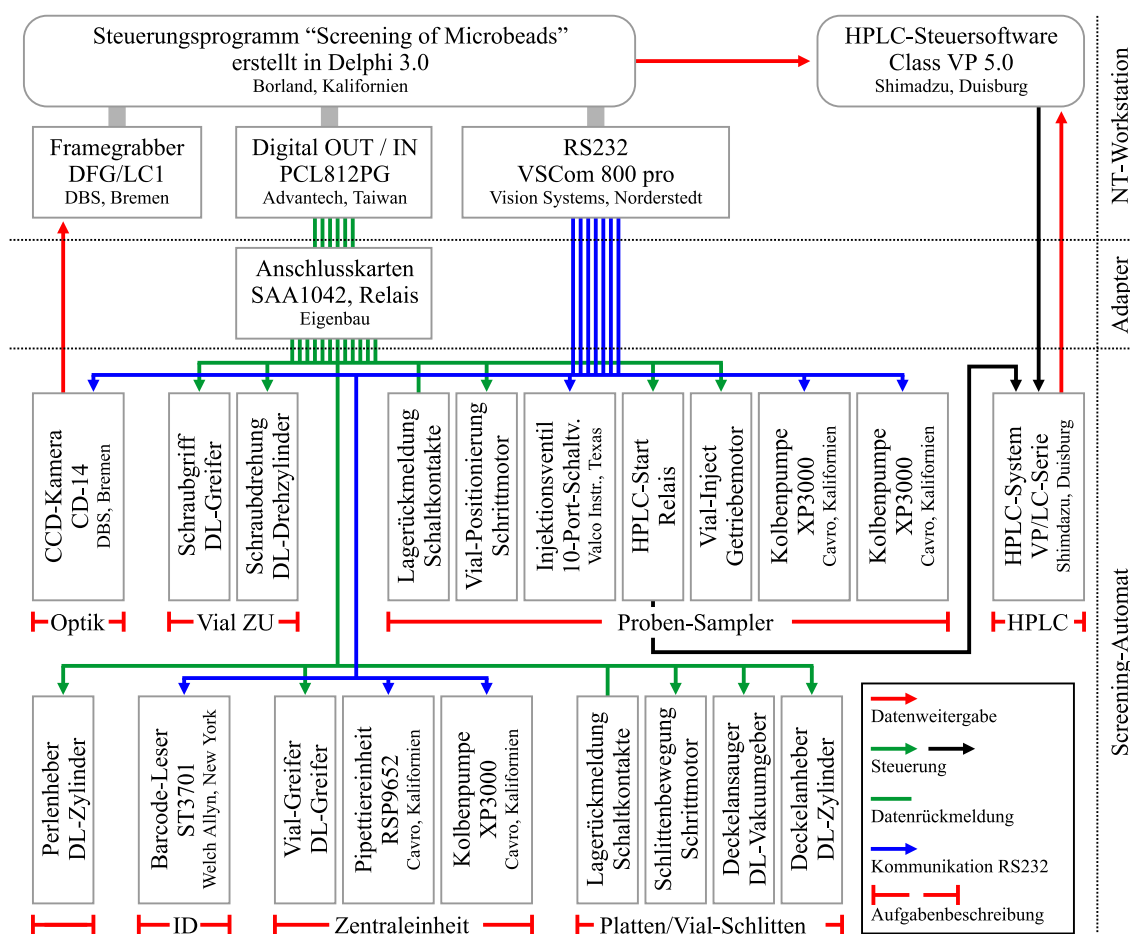


Abbildung 2.12: Übersichtsabbildung über das Zusammenspiel der Hardwarebauteile; dargestellt sind neben den einzelnen Komponenten auch die Informationswege von und zu den Computerschnittstellen und die Anbindung an die Steuerungs-Software.

Um die Geräte vor Verschmutzung zu schützen, wurde der gesamte Aufbau mit Plexiglas eingehaust und an der Zugangsseite ein Vorhang aus Kunststoffolie angebracht. Als weitere Maßnahme zur Aufrechterhaltung möglichst aseptischer Bedingungen wurde eine UV-Röhre (⑫ STE-RISOL Strahlerleiste 5014, 30 W, Heraeus MED GmbH, Hanau) oberhalb des Aufbaus montiert und über eine Zeitschaltuhr angeschlossen.

- | | |
|--|--|
| ① RSP9652 Grundgerät | ⑦ Pipettenspitzenvorrat |
| ② Pipettierarm | ⑧ Glasgefäß mit Hohlkugeln (im Hintergrund) |
| ③ XP3000 Kolbenpumpe für Pipettierarm | ⑨ Verschlussstation für Vials (im Hintergrund) |
| ④ Greiferarm | ⑩ Druckluftventile der Verschlussstation |
| ⑤ Verfahrstrecke mit Vakuumheber | ⑪ Autosampler-Einheit |
| ⑥ Barcode-Leser für Vial-Identifizierung | ⑫ UV-Röhre |

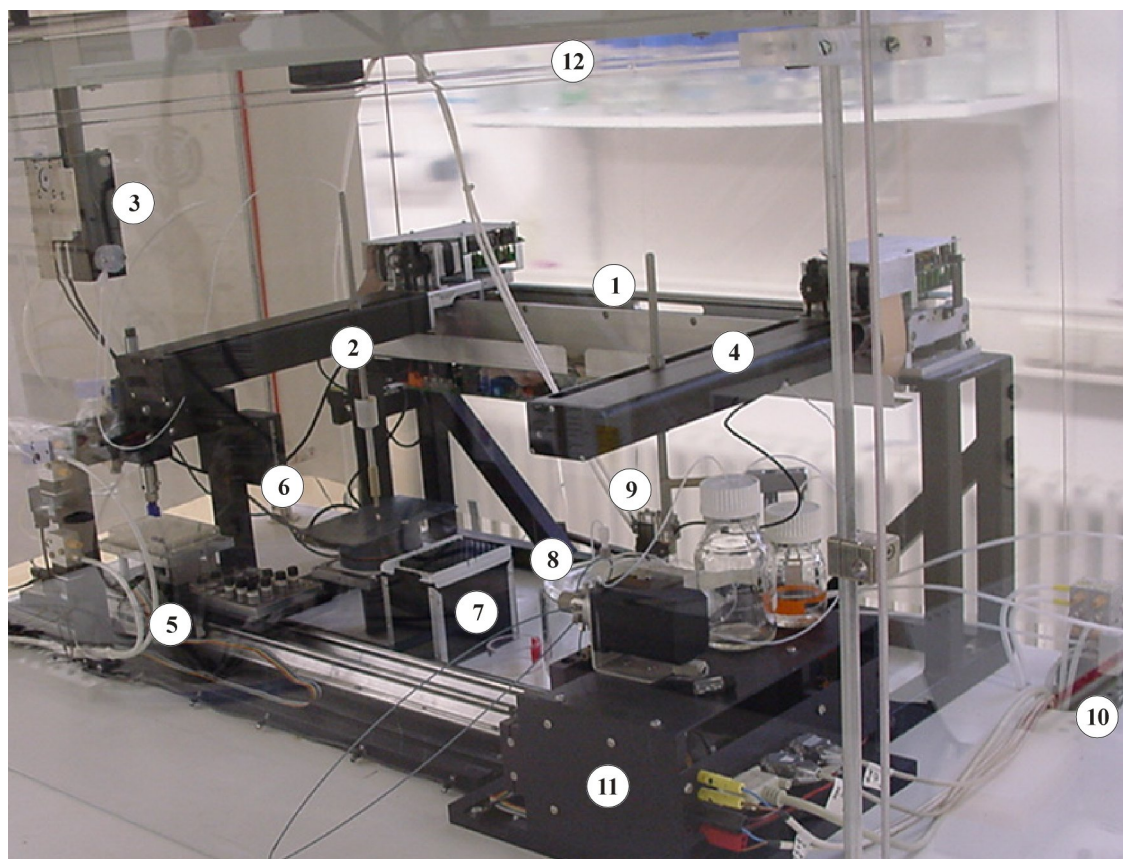


Abbildung 2.13: Foto des entwickelten Automaten, Aufnahme von der Rückseite.

2.3 Beschreibung der entwickelten Software

2.3.1 Auswahl der Entwicklungsumgebung Delphi

Das zur Steuerung des RSP-Moduls von Cavro mitgelieferte Programm **RUI-Software** hat keine grafische Oberfläche und ist nicht in der Lage, über standardisierte Windows-Mechanismen wie „dynamic data exchange“ (DDE) oder „dynamic link libraries“ (DLL) mit anderen Programmen zu kommunizieren. Eine Verbindung zwischen der Pipettiereinheit, dem HPLC-System und den weiteren Bauteilen war daher nur über ein eigenständiges Programm möglich.

Als Entwicklungsumgebung für dieses Programm wurde das Delphi-Paket der Borland Softwa-

re Corp. (Scotts Valley, Kalifornien) in der Standardausgabe der Version 3.0 gewählt ¹. Delphi baut auf das 1970 von Niklaus Wirth veröffentlichte Pascal auf (JENSEN & WIRTH, 1974), es ist objektorientiert und zahllose Quelltext-Bibliotheken sind frei verfügbar. Dem Anwender bietet Delphi alle Elemente eines zeitgemäßen CASE-Tools („computer aided software engineering“) und es ist neben C++ und Java Stand der Technik. Compilierte Programme laufen als 32-Bit-Anwendungen unter Windows (WANKEN, 1997).

2.3.2 Grundsätzlicher Aufbau

Es wurde entschieden, den Programmablaufplan aus Abschnitt 2.1.2 nicht direkt als Delphi-Programm umzusetzen, sondern das Programm „Screening-of-Microbeads“ sollte zunächst eine Schnittstelle zwischen dem Anwender und der Hardware des Automaten schaffen. Diese Schnittstelle hatte wenige Befehle bereitzustellen, deren Kombination die Abarbeitung der geforderten Handlungsabläufe ermöglichte. Durch dieses zweistufige Vorgehen sind etwaige Änderungen oder Erweiterungen im Ablaufplan sehr schnell umzusetzen.

Die erste Aufgabe bestand in der Entwicklung von Software-Äquivalenten für jedes der Bauteile. Diese Äquivalente haben die Einstellungen zu verwalten und Aktionen mit den Bauteilen durchzuführen. Delphi bietet für die Kapselung entsprechend zusammengehöriger Daten- und Programmstrukturen sogenannte Komponenten (**Components** in der englischen Syntax) an.

Alle Komponenten, die das Bindeglied zu Hardwarebauteilen darstellen, tragen den Namen **TxxxElement**, wobei **xxx** das Bauteil näher beschreibt. Sollen die Eigenschaften eines Elementes in Abhängigkeit von ihrer Verwendung im Rahmen des Programmes variierbar sein, so sind die entsprechenden Werte nicht fest im Quelltext festgelegt, sondern so programmiert, dass sie über die grafische Entwicklungsumgebung des Delphi-Paketes zugänglich sind („Properties“). Ein Beispiel für ein solches Property ist z. B. bei dem Element **TXPElement**, das eine Kolbenpumpe steuert, das Volumen der im Einzelfall eingebauten Spritze. Das Element **TXPElement** wird im Rahmen von „Screening-of-Microbeads“ dreimal verwendet, jedesmal ist jedoch ein anderer Wert für das Property **SyrVol** einzustellen.

Zur Koordinierung des Zusammenspiels der Elemente wurde die übergeordnete Containerkomponente **TElementContainer** entwickelt. Vom Hauptprogramm wird sie in dreifacher Ausfertigung verwendet, um die Elemente entsprechend den auf Seite 10 definierten Säulen Pipettieren, Vial-Transport und HPLC-Analyse zu gruppieren. Jede der drei Instanzen der Containerkomponente arbeitet als eigenständiger Prozess („Thread“), um eine parallele Abarbeitung zu ermöglichen.

¹Das Delphi-Paket gibt es mittlerweile als Version 6.0; da die Weiterentwicklung sich jedoch hauptsächlich auf Internet-Funktionalität und Server-Client-Mechanismen bezieht, wurde nicht auf die neueren Versionen gewechselt.

Der Quelltext des gesamten Programmes umfasst >5.600 Zeilen. Im Anhang findet sich in Abschnitt A.2 auf Seite 99 eine Auflistung der einzelnen Dateien und ihrer Funktion. Die Arbeitsweise und die Bedienung der entwickelten Komponenten sind auf den folgenden Seiten beschrieben.

2.3.3 Funktionsweise und Programmierung der Containerkomponente

Die Containerkomponente **TElementContainer** präsentiert sich dem Anwender dreigeteilt, wie in Abbildung 2.14 zu sehen ist. Oben befinden sich zwei Knöpfe, mit denen die Abarbeitung von Befehlssequenzen innerhalb des Containers gestartet und gestoppt werden kann. Darunter befindet sich ein Textfeld, in dem die jeweils bearbeitete Befehlsfolge angezeigt wird. Das Textfeld und die angebundenen Start- und Stoppschalter werden intern über die Komponente **TCommandListBox** verwaltet.

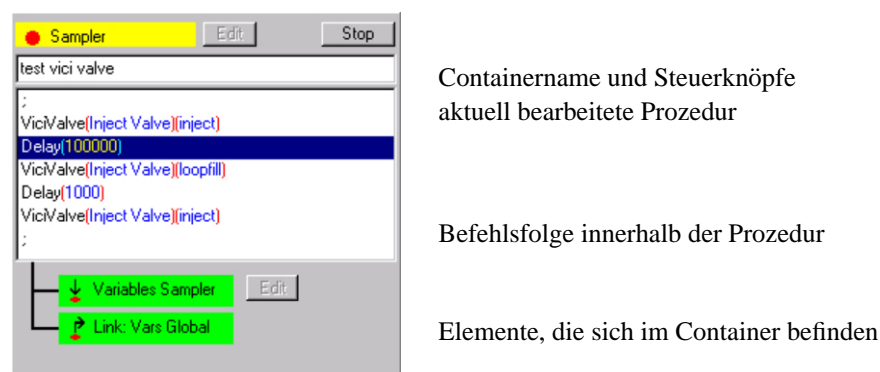


Abbildung 2.14: Graphischer Aufbau von **TElementContainer**.

Im unteren Teil des Containers sind die zugehörigen Elemente angeordnet. Zur Visualisierung, auf welches Element sich die aktuelle Befehlszeile bezieht, bewegt sich bei der Abarbeitung von Befehlsfolgen ein roter Punkt vom Textfeld zu dem jeweiligen Element.

Um auch für Anwender ohne Programmierkenntnisse bedient und hinsichtlich der Reihenfolge von Arbeitsschritten modifiziert werden zu können, sind die Befehlsfolgen eines Containers nicht in dem Delphi-Programm selber festgelegt. Sie können stattdessen innerhalb der Containerkomponente zusammengestellt werden, indem der Dialog **TProgEditDialog** des Containers aufgerufen wird (siehe Abbildung 2.15).

Dieser Dialog ist die wichtigste Schnittstelle zwischen dem Applikationsentwickler und dem Programm „Screening-of-Microbeads“. Der linke Teil des Dialoges listet in der oberen Hälfte die definierten Prozeduren auf. Eine Prozedur entspricht dabei einer in sich geschlossenen Befehlsfolge, die mit einem möglichst aussagekräftigen Namen versehen werden sollte. Über Schaltknöpfe können neue Prozeduren erstellt, vorhandene dupliziert oder nicht mehr benötigte Prozeduren endgültig gelöscht werden.

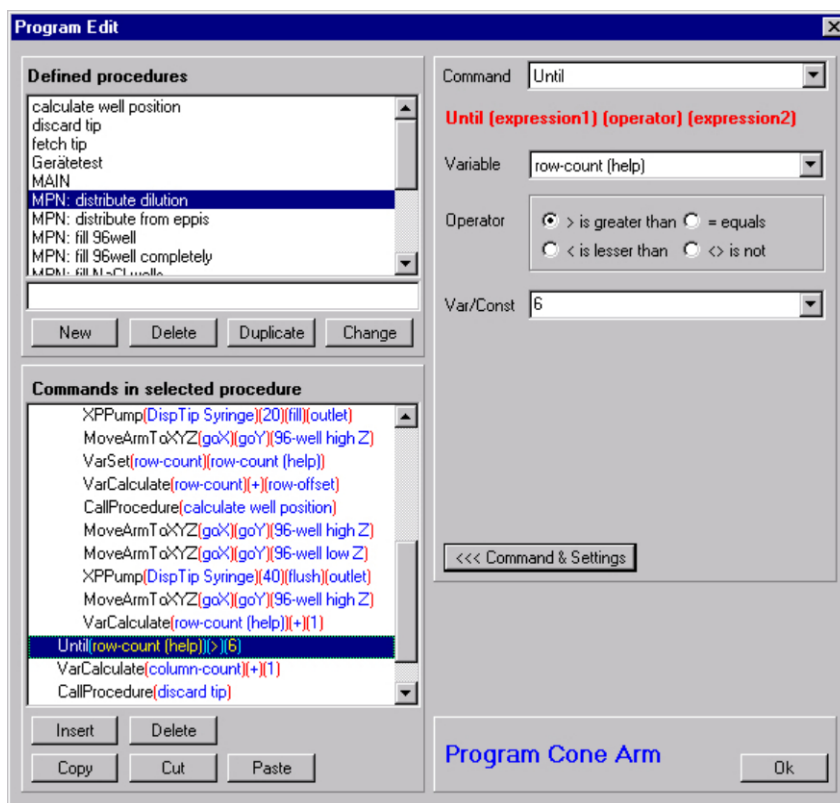


Abbildung 2.15: Bildschirmdialog von **TProgEditDialog** (oben links die Liste der definierten Prozeduren, darunter die Befehlsfolge der aktuell gewählten Prozedur; im rechten Teil die Auswahlfelder zum Definieren der einzelnen Befehle, dargestellt am Beispiel des Befehles **Until**).

Eine Prozedur wird durch einfaches Anklicken mit der Maus zur Bearbeitung ausgewählt, wodurch ihre Befehlsfolge in dem Dialogbereich unten links dargestellt wird. Für die Bearbeitung können Befehlszeilen über entsprechende Schaltknöpfe neu eingefügt, gelöscht und kopiert bzw. ausgeschnitten und wieder eingefügt werden. Jede Zeile entspricht einem Befehl und die Auswahl bzw. Anpassung des gewünschten Befehles ist durch einen Mausklick auf die zu verändernde Zeile möglich, wodurch der aktuelle Inhalt der Programmzeile in den rechten Teil des Dialoges **TProgEditDialog** übertragen wird. Dort kann über eine Auswahlliste zum einen der Befehl selber ausgewählt werden, abhängig von der Syntax des gewählten Befehles erscheinen jedoch auch spezifische, weitere Eingabefelder. Mit diesen Feldern werden die Parameter eingestellt, die für die spätere Abarbeitung benötigt werden. Der veränderte Befehl wird durch Klicken auf einen Schaltknopf von der rechten Seite in die ursprünglich ausgewählte Zeile übertragen und erst hierdurch die alte Definition überschrieben.

Die so zusammengestellten Befehlsfolgen werden vom Programm in Textform abgespeichert und während der Abarbeitung Zeile für Zeile analysiert und ausgeführt. Dieses Interpreter-Verhalten entspricht der Funktionsweise der Programmiersprache BASIC – im Gegensatz zu dieser können bei „Screening-of-Microbeads“ jedoch keine syntaktischen Programmfehler auftreten, da die Befehlsfolgen nicht durch den Anwender eingegeben sondern lediglich wie be-

schrieben über Auswahllisten erstellt werden.

2.3.4 Aufbau und Eigenschaften der weiteren Elemente

Jedes der Elemente wird in der Containerkomponente, die es beherbergt, in Form eines farbigen Rechteckes dargestellt, das mit dem Namen der Instanz des Elementes beschriftet ist (Property **ElementName**). Zur Verdeutlichung der Aufgabe des Elementes hat jedes dieser Rechtecke eine kleine Zeichnung („Icon“), deren Inhalt sich ggf. in Abhängigkeit vom Schaltzustand eines angeschlossenen Hardwarebauteiles ändern kann. Allen Elementen ist weiterhin gemein, dass abhängig vom Property **Disabled** das gesamte Rechteck durchgestrichen dargestellt wird, wenn das entsprechende Element inaktiv ist. Dies ist z. B. der Fall, wenn die Initialisierung eines Hardwarebauteiles beim Programmstart nicht fehlerfrei gelingt.

Die bisher beschriebenen Eigenschaften sind in **TCustomElement** definiert, von dem sich alle nachfolgenden Elemente ableiten. Neben den Visualisierungsaufgaben kümmert sich **TCustomElement** um das Lesen und Schreiben von Elementeinstellungen und führt zu Programmstart eine Initialisierungsroutine durch. Erfordert es ein abgeleitetes Element, während des laufenden Programmes umfangreiche Einstellungen vornehmen zu können, so gibt es spezielle Dialoge hierfür. Der Aufruf dieser Dialoge erfolgt über den Elementen zugeordnete Schaltknöpfe. Die Verbindung zwischen deenen entsprechenden Schaltknöpfen und bestimmten Elementen wird von Instanzen der neuen Komponente **TLinkedButton** ermöglicht.

Mehrere der angeschlossenen Hardwarebauteile werden über die serielle Schnittstelle gesteuert. Hierfür werden Instanzen der Komponente **TCommPortDriver**² verwendet, die von den Elementen über ihr Property **RS232Link** angesprochen werden.

TRelayElement (gelb)

Dieses Element schaltet ein Relais, das sich auf einer unter Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Relais-Platine befindet. Die Properties **CardNum** (1 bis 8) bzw. **RelayNum** (0 oder 1) spezifizieren das gewünschte Relais. Die beiden Schaltzustände können mit den Namen **OffName** bzw. **OnName** und den zugehörigen Icons **OffIconIndex** bzw. **OnIconIndex** beschrieben werden. Den aktuellen Schaltzustand gibt **State** an.

TMotorElement (hellrot)

Ein über die Relais-Platine **CardNum** angeschlossener Schrittmotor wird angesteuert. Über **OffName**, **CWName**, **CCWName**, **OffIconIndex**, **CWIconIndex** und **CCWIconIndex** können Namen und Icons für den Stillstand und beide Drehrichtungen (CW = „clockwise“/rechts herum bzw. CCW = „counterclockwise“/linksherum) vergeben werden. An die mit **CWDigInNum** und **CCWDigInNum** bezeichneten digitalen Eingangskanäle sind die jeweiligen Endlagenschalter angeschlossen und **StepMode** definiert die Schrittweite des Schrittmotors. Zur Initialisierung

²Die Komponente **TCommPortDriver** ist in der Bibliothek **ComDrv32.pas** enthalten, die von dem Software-Autor M. COCCO unter <http://www.mdilive.com/d3k/> kostenfrei bereitgestellt wird.

fährt der Schrittmotor in die mit **Home** bezeichnete Richtung, bis der entsprechende Endlagenschalter erreicht wird.

Im Einstellungsdialog **TMotorEditDialog** (siehe Abbildung 2.16) kann der Motor in beide Richtungen bewegt und gewünschte Positionen mit einem Namen versehen werden.

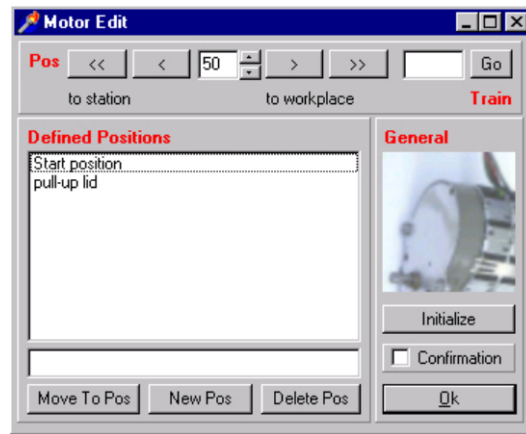


Abbildung 2.16: Bildschirmdialog von **TMotorEditDialog** (oben die Knöpfe, um den Motor im Einzel- oder Mehrschrittmodus an die gewünschte Position zu bewegen, darunter die Liste der bereits definierten Positionen und die Knöpfe, diese zu verwalten).

TVarListElement (hellgrün)

Um bei der Zusammenstellung von Befehlsfolgen Entscheidungen treffen bzw. Schleifen aufbauen zu können, muss es die Möglichkeit geben, Zwischenwerte speichern und verändern zu können. Die hierfür benötigten Variablen werden von dem Element **TVarListElement** verwaltet und zur Verfügung gestellt. Über den Dialog **TEditVariablesDialog** können während der Laufzeit neue Variablen definiert werden.

Eine Sonderform von **TVarListElement** liegt vor, wenn das Property **LinkVarList** benutzt wird und auf eine weitere Instanz von **TVarListElement** in einer anderen Containerkomponente zeigt: Dann wird keine eigene Variablenliste generiert und verwaltet, sondern stattdessen die Liste des zugeordneten Elementes verwendet. Hierdurch ist es möglich, Variablen zu definieren, die von allen drei Threads zugänglich sind.

TBarCodeElement (orange)

Dieses Element liest Daten eines Barcode-Scanners über die serielle Schnittstelle ein.

TValveElement (hellblau)

Über die serielle Schnittstelle wird ein HPLC-Schaltventil gesteuert. Die Schaltstellung gibt **Position** (**A** oder **B**) an, über **IconA** und **IconB** werden entsprechende Icons zugeordnet.

TCCDElement (grün)

Dieses Element steuert eine CCD-Kamera und liest die von der Kamera gelieferten Bilder über eine Framegrabber-Karte. In dem Einstellungsdialog **TCCDEditSettingsDialog** (siehe Abbildung 2.17) können Vergrößerungsfaktor, Bildschärfe, Helligkeit und Farbtintensitäten eingestellt

und „regions-of-interest“ (ROI) definiert werden. ROI stellen Bildbereiche dar, die auszuwertende Information beinhalten. Bei der Begutachtung einer Hohlkugel ist dies lediglich ein einziger kreisrunder Bereich, bei der Auswertung einer bewachsenen Mikrotiterplatten sind es die 96 regelmäßig angeordneten Kavitäten. Entsprechende Muster lassen sich einstellen, indem anhand von drei auf der Bildfläche mit der Maus positionierbaren Kreisen variabler Größe der Startpunkt und die Endpunkte und die Anzahl in horizontaler und vertikaler Richtung angegeben werden.



Abbildung 2.17: Bildschirmdialog von **TCCDEditSettingsDialog** (im Hauptfeld die aktuelle Aufnahme der CCD-Kamera, die drei farbigen Kreise definieren die im Text beschriebenen ROI für die Bildauswertung; rechts die Steuerknöpfe zur Einstellung der Farb- und ROI-Werte; unten Schieberegler zur Schärfen- und Vergrößerungseinstellung).

TXPElement (orange)

Wie bereits einleitend erwähnt, stellt **TXPElement** die Verbindung zu einer Kolbenpumpe des Typs XP3000 mit integriertem Dreiwegeschaltventil her. Die Properties **IconIn** und **IconOut** bezeichnen die Icons, die die Stellung des Ventils anzeigen, über **SyrVol** wird das Volumen der eingebauten Spritze angegeben. Das Volumen wird benötigt, damit das Element berechnen kann, wieviele Schritte für die Dosierung einer gewünschten Mikrolitermenge notwendig sind.

TRSPElement (weiß)

Das Element **TRSPElement** steuert die Bewegungen eines Armes des verwendeten Pipettierautomaten RSP9652. Die Properties **MaxPosAbsX**, **MaxPosAbsY** und **MaxPosAbsZ** geben den

maximalen Bewegungsrahmen des Armes an, das Property **DiTiOption** informiert, ob der Arm in der Lage ist, Pipettenspitzen aufzunehmen. Da die Bewegungen der Arme u. U. aufeinander abgestimmt werden müssen, muss das Property **OtherArm** auf den jeweils anderen Arm verweisen.

Wie in Abbildung 2.18 zu sehen ist, bietet der zugehörige Dialog **TRSPPositioningDialog** umfangreiche Einstellmöglichkeiten. Die in ein Foto des Pipettiergerätes eingeblendeten Schaltknöpfe ermöglichen die direkte Bewegung in alle drei Raumrichtungen in kleinen und großen Schritten, wobei die Schrittweite für große Schritte variabel ist. Durch Eingabe eines Namens

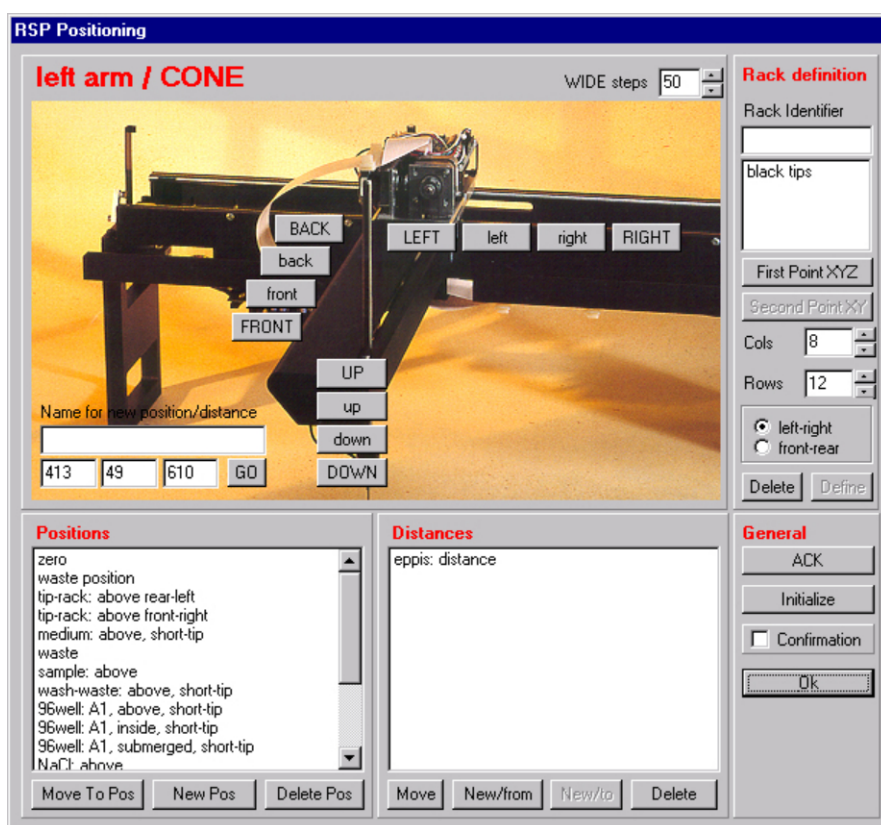


Abbildung 2.18: Bildschirmdialog von **TRSPPositioningDialog** (im Hauptfeld eine Abbildung des Armes mit Knöpfen für Einschritt- und Mehrschrittbewegungen in alle drei Raumrichtungen, außerdem Eingabefelder zur Benennung von Positionen bzw. Entfernungen und Angabe von Koordinaten für eine Zielbewegung; darunter Listen der bereits definierten Positionen und Entfernungen und Knöpfe, diese zu bearbeiten; rechts Einstellmöglichkeiten zur Definition von Pipettenspitzen-Racks).

können gewünschte Positionen gespeichert werden, zusätzlich ist auch die Benennung von Distanzen möglich. Hierzu ist am Startpunkt einer entsprechenden Distanz der Schaltknopf **New/from** zu betätigen und dann der Arm an den Endpunkt zu bewegen. Über den Schaltknopf **New/to** wird die zwischen beiden Punkten befindliche Distanz unter dem in der Eingabezeile eingegebenen Namen abgespeichert, wobei alle drei Raumrichtungen gleichermaßen berücksichtigt werden.

Im rechten Teil des Dialoges finden sich Speichermöglichkeiten für sogenannte „Racks“. Hier-

mit werden gleichmäßige Anordnungen von z. B. Pipettenspitzen bezeichnet. Diese werden durch einen Startpunkt (X-, Y- und Z-Angabe), einen Endpunkt (X- und Y-Koordinate), Reihen- und Spaltenanzahl und eine Angabe, ob sich das Rack von links nach rechts oder von vorne nach hinten aufbaut, definiert. Wie Positionen und Distanzen werden auch Racks unter einem beschreibenden Namen abgespeichert.

TProcListElement (gelb)

Dieses Element verwaltet die vom Anwender festgelegten Befehlsfolgen und arbeitet mit dem bereits oben beschriebenen Dialog **TProgEditDialog** zusammen. Es hat lediglich für den internen Datenfluss des Programmes eine Funktion, der Anwender verwendet es nicht direkt.

TRemoteElement (weiß)

Wie in Abschnitt 2.1.3 ausgeführt, sollen die Funktionen des Greiferarmes für die beiden anderen Arbeitssäulen Pipettieren und HPLC-Analysen zugänglich sein. Das Element **TRemoteElement** stellt über das Property **LinkedComLB** die Verbindung zu der **TCommandListBox**-Komponente und damit dem Befehlssatz eines anderen Containers her. Hierdurch werden die dort eingeordneten Elemente über die für sie definierten Befehlsfolgen zugänglich.

In Abbildung 2.19 auf Seite 30 ist die Anordnung aller Elemente innerhalb der drei Containerkomponenten des Hauptprogrammes von „Screening-of-Microbeads“ zu sehen.

2.3.5 Beschreibung der bereitgestellten Befehle

Die beschriebenen Elemente stellen der Containerkomponente, in der sie eingebettet sind, Befehle zur Verfügung³. Über den bereits vorgestellten Dialog **TProgEditDialog** können die Aufgaben des Screening-Automaten durch das Zusammenstellen komplexer Befehlsfolgen definiert werden. Auch der Aufbau von Schleifen und Bedingungsblöcken ist möglich.

; comment Ein Kommentar oder lediglich das Semikolon selber stehen in der Programmzeile. Der Befehl dient zur Strukturierung und Dokumentation von Befehlsfolgen.

MoveArmTo(position) Der Arm des RSP9652 wird an die mit **position** bezeichnete Stelle bewegt. **position** ist eine im Einstellungsdialog **TRSPPositioningDialog** der Komponente **TRSPElement** definierte Stellung der drei Raumachsen.

MoveArmBy(distance)(+/-) Der Arm des RSP9652 bewegt sich um die im Einstellungsdialog **TRSPPositioningDialog** definierte Distanz. Abhängig vom zweiten Parameter ('+' bzw. '-') erfolgt diese Bewegung wie definiert oder in die umgekehrte Richtung, wobei die Richtungsumkehr für alle drei Raumachsen gilt.

³Der Name eines Befehles wird durch die Darstellung **Befehl** verdeutlicht, ein Variablenname durch **var**. Ist der Wert gemeint, den eine Variable annehmen kann, so wird dies mit '**wert**' verdeutlicht.

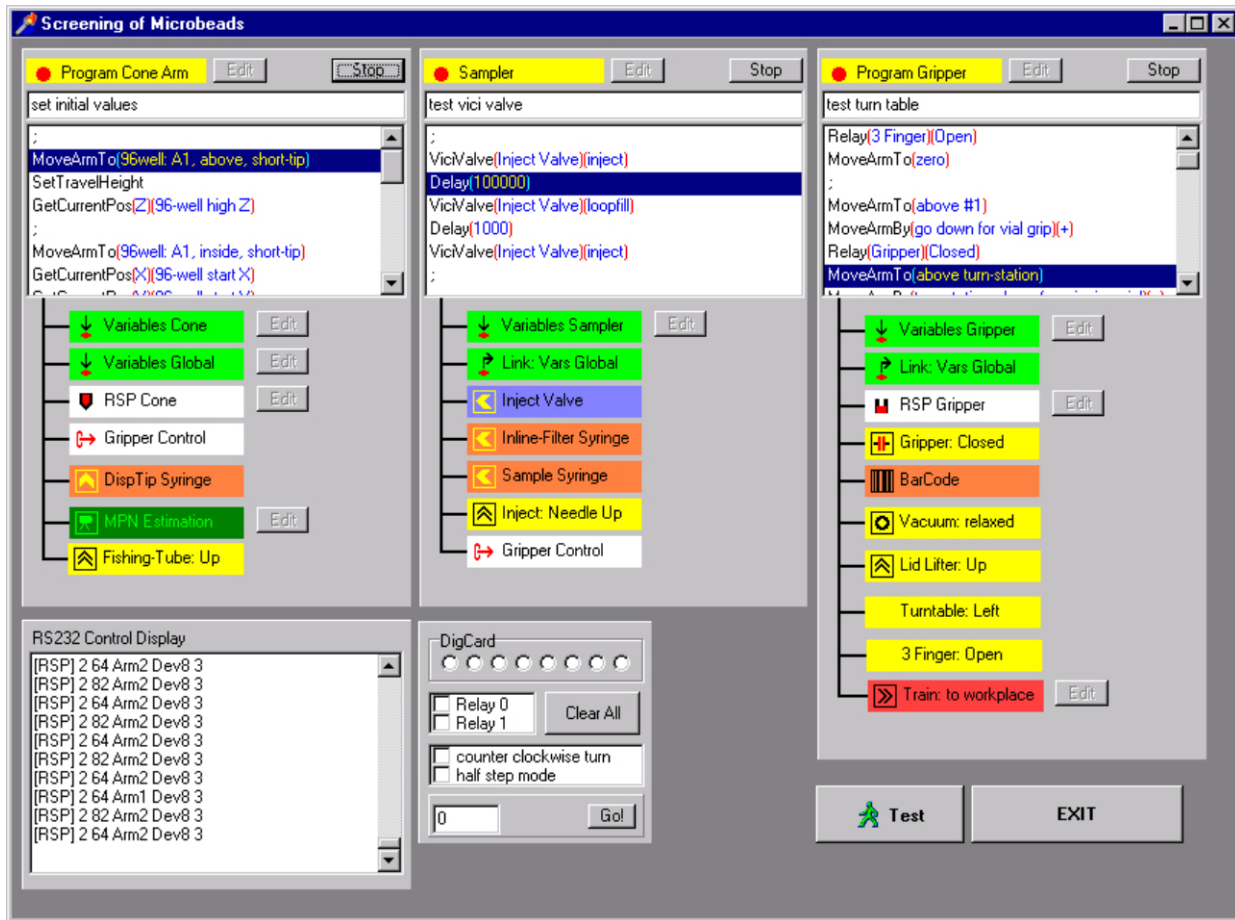


Abbildung 2.19: Bildschirmausgabe des Hauptprogrammes (oben die drei Containerelemente zur Steuerung des Pipettierarmes, des Autosamplers und des Greiferarmes; darunter Kontrollfenster der Kommunikation mit den RS232-Schnittstellen und Knöpfe zur direkten Einstellung der angeschlossenen Relaisplatinen).

MoveArmToXYZ(*var-x*)(*var-y*)(*var-z*) Der Arm des RSP9652 bewegt sich an die mit den drei Parametern bezeichnete Position. Jeder der Parameter kann dabei entweder direkt eine Zahlenangabe darstellen oder aber eine Variable angeben, aus der die gewünschte Koordinate ausgelesen wird.

GetCurrentPos(X/Y/Z)(*variable*) Abhängig vom ersten Parameter ('X', 'Y' oder 'Z') wird die X-, Y- oder Z-Koordinate der aktuellen Position des RSP-Armes in ***variable*** gespeichert.

SetTravelHeight Für zahlreiche interne Befehle des RSP-Armes (z. B. das Holen einer Pipettenspitze) kann die Höhe (Position der Z-Achse), auf der eine Bewegung verläuft, festgelegt werden. Sollen diese Bewegungen nicht in völlig hochgefahrter Position ('0') erfolgen, so ist der Arm in die gewünschte Höhe zu bringen und einmalig der Befehl **SetTravelHeight** aufzurufen.

FetchTip(*rack-name*)(*tip-pos*) Aus der mit ***tip-pos*** benannten Position des im RSP-Einstellungsdialog **TRSPPositioningDialog** definierten Racks ***rack-name*** wird eine Pipetten-

spitze geholt.

DiscardTip(position) Die am Arm befindliche Pipettenspitze wird an der mit **position** bezeichneten Stelle durch völliges Hochfahren des Armes abgeworfen.

DetectLiquidStart Der RSP-Arm wird langsam gesenkt, bis die Pipettenspitze auf eine Flüssigkeitsoberfläche trifft. Die Detektion ist nur möglich, wenn leitfähige Spitzen verwendet werden.

DetectLiquidStop Der RSP-Arm wird in die Position zurückgefahren, die er vor dem letzten **DetectLiquidStart** hatte.

BarCode(var) Über den Barcode-Scanner wird die Codierung eines beschrifteten Vials gelesen und das Ergebnis in **var** gespeichert.

ViciValve(name)(status) Das HPLC-Schaltventil **name** wird entsprechend **status** geschaltet, wobei dieser Parameter die Werte **'inject'** bzw. **'loopfill'** annehmen kann.

Relay(name)(status) Das Schaltrelais **name** wird entsprechend **status** geschaltet. Die Benennung der beiden möglichen Schaltzustände richtet sich nach der Funktion des Schaltrelais, ein mögliches Wertepaar ist z. B. **'turn-left'** und **'turn-right'** im Falle des Drehzylinders zum Zuschrauben der Vials.

XPump(pump)(volume)(fill/flush)(valve) Die Kolbenpumpe **pump** wird mit **volume** (Angabe in Mikrolitern) gefüllt (dritter Parameter ist **'fill'**) bzw. geleert (entspricht **'flush'**). Ob dies über den Eingangs- oder Ausgangsport der Kolbenspritze geschieht, gibt der Inhalt von **valve** an.

Message(output) Die Nachricht **output** wird am Bildschirm ausgegeben. Der Meldungsdialog verfügt über einen **Abbrechen**-Knopf, sodass dieser Befehl gleichzeitig die Möglichkeit bietet, die Abarbeitung einer Befehlsfolge abubrechen.

GetData(description)(number) Dem Anwender wird über einen Dialog unter Angabe von **description** eine Eingabezeile präsentiert. Dieser Befehl kann verwendet werden, um während der Abarbeitung von Befehlssequenzen Abfragen vorzunehmen.

VarSet(var)(new-var/value) Die Variable **var** wird mit einem festen Wert bzw. dem Inhalt einer anderen Variablen belegt.

VarCalculate(source/target)(operator)(var) Am Inhalt der im ersten Parameter angegebenen Variablen wird eine mathematische Operation entsprechend **operator** vorgenommen und das Ergebnis wieder in **source/target** gespeichert. Neben den vier Grundrechenarten stehen der Diviso- und der Modulo-Operator zur Verfügung, um bei Divisionen das ganzzahlige Ergebnis bzw. den Rest zu erhalten.

```

VarSet(counter)(30)
GetData(Bitte eine Zahl eingeben)(lieswert)
VarCalculate(counter)(+)(lieswert)
Message(counter)

```

Durch diese Befehle wird die Variable **counter** mit dem Wert **'30'** belegt und nach einem Wert für die Variable **lieswert** gefragt. Wird hier z. B. der Wert **'12'** eingegeben, so gibt der abschließende Dialog als Ergebnis **'42'** aus.

IfBegin(expression1)(operator)(expression2) Anhand von **operator** werden die beiden Ausdrücke **expression1** und **expression2** verglichen. Liefert dieser Vergleich ein wahres Ergebnis, so wird die Befehlssequenz mit dem direkt folgenden Befehl fortgesetzt, andernfalls werden alle Befehle bis zum nächsten **IfEnd** übersprungen. **operator** kann hierbei die Werte **'<'**, **'>'**, **'='** und **'<>'** annehmen.

IfEnd Zeigt das Ende einer über **IfBegin** eingeleiteten Befehlsstruktur ein.

Repeat Leitet eine Schleifenstruktur ein, die über **Until** beendet wird.

Until(expression1)(operator)(expression2) Anhand von **operator** werden die beiden Ausdrücke **expression1** und **expression2** verglichen. Liefert dieser Vergleich ein wahres Ergebnis, so wird die Befehlssequenz mit dem direkt folgenden Befehl fortgesetzt, andernfalls wird zu dem über den Befehl **Repeat** definiertem Anfang des Schleifenblockes zurückgesprungen. **operator** kann für den Vergleich die Werte **'<'**, **'>'**, **'='** und **'<>'** annehmen.

Sowohl die Schleifen- als auch die Bedingungsstruktur können mehrfach und ineinander verschachtelt verwendet werden.

```

Repeat
  GetData(Rate meine Zahl)(lieswert)
  IfBegin(lieswert)(<)(42)
    Message(Die Zahl ist leider zu klein)
  IfEnd
  IfBegin(lieswert)(>)(42)
    Message(Die Zahl ist leider zu groß)
  IfEnd
  IfBegin(lieswert)(=)(42)
    Message(Die Antwort ist richtig!)
  IfEnd
  GetData(Noch ein Spiel? (1=Ja, 2=Nein)(lieswert)
Until(lieswert)(=)(2)

```


Diese Befehlssequenz fragt den Anwender nach einer Zahl, die dann in mehreren **IfBegin-IfEnd**-Strukturen durch Vergleich mit der Vorgabe ('42') bewertet wird. Dieses kleine Ratespiel wird fortgesetzt, bis die äußere **Repeat-Until**-Schleife durch Eingabe einer '2' im zweiten Dialog beendet wird.

Delay(time/msec) Die Abarbeitung der Befehlssequenz wird für die Zeitspanne **time** (angegeben in Millisekunden) ausgesetzt.

CallProc(procedure) Die Bearbeitung der aktuellen Befehlsfolge wird ausgesetzt, und es wird in die im gleichen Containerelement definierte und mit **procedure** angegebene Sequenz verzweigt. Erst wenn diese neue, gerufene Befehlssequenz beendet ist, kommt der nächste Befehl aus der aufrufenden Sequenz zur Bearbeitung.

RunRemoteProc(procedure) In der über das korrespondierende **TRemoteElement** angesprochenen Containerkomponente wird die Befehlsfolge **procedure** gestartet bzw. in eine Warteschleife gestellt, falls dort bereits eine andere Prozedur abgearbeitet wird. Ohne im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Befehl **CallProc** auf das Ende der aufgerufenen Sequenz zu warten, wird in dem aufrufenden Container sofort mit der Bearbeitung der aktuellen Befehlsfolge fortgefahren.

WaitFor(expression1)(operator)(expression2) An diesem Befehl stoppt die Abarbeitung der aktuellen Befehlsfolge, bis der Vergleich von **expression1** mit **expression2** unter Anwendung von **operator** ein wahres Ergebnis liefert. **operator** kann die Werte '<', '>', '=' und '<>' annehmen. In Zusammenhang mit dem Befehl **RunRemoteProc** kann so das Zusammenspiel von zwei Elementcontainern aufeinander abgestimmt werden.

Der Befehl **WaitFor** könnte auch durch eine Kombination aus **Repeat-Until**-Befehlen nachgebildet werden. Die Bereitstellung als eigenständiger Befehl ist jedoch hinsichtlich der Bearbeitungsgeschwindigkeit und vor allem der Kontrolle der intern ablaufenden Prozesse deutlich zu bevorzugen.

Definition von **zaehl-sequenz** im ersten Containerelement:

```
VarCalculate(zaehler)(+)(1)
Delay(500)
```

Definition von **demo-sequenz** im ersten Containerelement:

```
VarSet(zaehler)(0)
Repeat
    CallProc(zaehl-sequenz)
Until(zaehler)(=)(10)
VarSet(fertig)(1)
```

Hauptsequenz im zweiten Containerelement:

VarSet(*fertig*)(0)

RunRemoteProc(*demo-sequenz*)

Message(*Im ersten Container arbeitet eine Sequenz parallel!*)

WaitFor(*fertig*)(=)(1)

Message(*Jetzt ist die Sequenz im ersten Container beendet.*)

Im zweiten Containerelement wird zunächst die Hilfsvariable **fertig** mit '0' belegt und anschließend parallel im ersten Container die Sequenz **demo-sequenz** gestartet. Diese zählt unter Zuhilfenahme der Untersequenz **zaehl-sequenz** mit **zaehler** von '0' bis '10' und wartet nach jedem Schritt für eine halbe Sekunde. Gleichzeitig wird im zweiten Container ein Meldungsdialog angezeigt und anschließend so lange gewartet, bis der Zählvorgang abgeschlossen ist, was durch das Setzen von **fertig** auf '1' signalisiert wird.

AnalyseCCD(out-var) Der in **TCCDElement** definierte, kreisförmige Ausschnitt eines aufgenommenen Bildes wird analysiert und die durchschnittliche Farbintensität zurückgegeben.

StartHPLC(name-var) An die parallel laufende HPLC-Software **Class VP** wird über das Hilfsprogramm **RCVP50** (Shimadzu Deutschland GmbH, Düsseldorf) die Aufforderung weitergegeben, eine Messung vorzubereiten, die dann über ein externes Signal gestartet wird. Der Name für die aufzunehmenden Daten wird in der Variablen **name-var** vorgegeben, im Regelfall ist es die Nummer des gerade bearbeiteten Vials, die über das Barcode-Modul ausgelesen werden kann.

Kapitel 3

Screening-Automation – Ergebnisdiskussion und Ausblick

3.1 Durchführung von Mikro-MPN-Bestimmungen

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Automat ist vorrangig auf die Handhabung von Mikrobioreaktoren in Form von Hohlperlen ausgelegt. Dennoch sollte untersucht werden, ob sich die eingesetzte Hardware, insbesondere die Pipettiereinheit, zur Bestimmung von Keimzahlen auf Basis des Verfahrens der „most probable number“ (MPN) eignet. Hierbei wird die Probe in mehreren Parallelen verdünnt und Wachstumsmedium angeimpft. Aufgrund der Zahl der bewachsenen Parallelen pro Verdünnung kann unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und statistischer Gesetze (Poisson-Verteilung) die Keimzahl abgeschätzt werden. Erste Wertetabellen hierzu wurden von MCGRADY (1915) veröffentlicht, und das Verfahren ist heute in vielen Bereichen als Standard anerkannt ([AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1985](#)). Für gewöhnlich werden Volumina von 10 mL für Verdünnung und Medium eingesetzt.

Entsprechend Abschnitt [B.1](#) auf Seite [103](#) wurden Versuche zur Mikro-MPN-Bestimmung mit der Pipettiereinheit und dem Bakterium *Enterococcus faecium* durchgeführt. Dieser Organismus wurde u. a. gewählt, weil er eine kurze Verdoppelungszeit hat und sich die Zellen bei dem verwendeten Medium intensiv rot färben und eine optische Auswertung erleichtern. Es zeigt sich, dass zunächst ein erhebliches Kontaminationsproblem vorlag, da eigentlich sterile Ansätze z. T. ein starkes Wachstum aufwiesen.

Um eine Verschleppung von Probenmaterial zu vermeiden und möglichst aseptische Bedingungen zu gewährleisten, wurden die folgenden Faktoren untersucht und bewertet:

Einhausung Der Automat wurde mit einem Plexiglasgehäuse versehen und die Zugangsöffnung mit Kunststofffolie verhängt, um Luftzug von außen zu vermeiden.

Pipettierverhalten Beim Herausdrücken zellhaltiger Suspensionen aus der Pipettenspitze sollte sich diese möglichst unter der Oberfläche der aufnehmenden Flüssigkeit befinden, um Aerosolbildung zu vermeiden.

Spitzenauswahl Von Cavo werden passend zu der DiTi-Option des Pipettierarmes Spitzen mit einem eingebauten Tiefenfilter angeboten, die ebenfalls das Aerosolproblem minimieren.

Geschwindigkeit Der Einfluss sowohl der Bewegungsgeschwindigkeit der RSP-Arme als auch der Aufsauge- und Abgabegeschwindigkeit der zum Pipettieren verwendeten Kolbenspritze wurden untersucht. Ein Zusammenhang mit dem Kontaminationsproblem konnte nicht beobachtet werden.

Oberflächensterilisation Nach dem Abwischen der zugänglichen Oberflächen mit Ethanol und Bestrahlung durch die aufgehängte UV-Lampe wurde ein Rückgang der Kontamination beobachtet. Da das RSP-Kernstück jedoch kein schützendes Gehäuse aufweist und zu befürchten war, dass das ultraviolette Licht die frei verlegten Leitungen schädigt, konnte die UV-Lampe nur stundenweise eingeschaltet werden.

Durch die beschriebenen Maßnahmen konnte die Kontaminationsrate auf unter 3 % gesenkt werden, von 96 mit sterilem Medium befüllten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte waren durchschnittlich noch zwei Wells bewachsen/kontaminiert. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob z. B. durch die gezielte Viskositätssteigerung der zu pipettierenden Lösungen dieser Wert weiter gesenkt oder bestimmte Maßnahmen wie der relativ teure Einsatz der filterbestückten Pipettenspitzen zurückgenommen werden können. Eine Verbesserung ist weiterhin zu erwarten, wenn alle verwendeten Baugruppen eingekapselt werden und so eine intensivere UV-Sterilisation möglich wird.

Hinsichtlich der eigentlichen Keimzahluntersuchung wurde festgestellt, dass bei Erstellung von fünf Parallelen die Keimzahl in der zu untersuchenden Probe bereits auf eine Zehnerpotenz genau bestimmt werden konnte. Unter Berücksichtigung der in den Versuchen eingesetzten hohen Bakterienkonzentrationen im Bereich von $1 \cdot 10^9$ Zellen/mL entspricht diese Genauigkeit den Erwartungen. Ausführliche Berechnungen zur Fehlerbetrachtung finden sich in der Literatur bei z. B. WEISSWANGE (1990). Dieser untersuchte die grundsätzliche Übertragbarkeit der MPN-Methode in den Mikromaßstab anhand von Verdünnungs- bzw. Inokulationsvolumina von $1 \mu\text{L}$ zu $100 \mu\text{L}$ Medium und fand eine gute Übereinstimmung mit den Werten, die durch Vergleichsuntersuchungen im herkömmlichen Maßstab erhalten wurden.

3.2 Herstellung und Einsatz von Mikrobioreaktoren

Nach Vorversuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Alginat und an Calciumionen und unterschiedlichen Vernetzungszeiten ergab die folgende Rezeptur die am besten geeigneten

Hohlkugeln. Die genaue Versuchsvorschrift findet sich in Abschnitt B.2.1 auf Seite 103, wo auch eine Apparatur zur aseptischen Herstellung beschrieben ist.

- 1,5 % (w/w) Calciumchloridlösung
- Erhöhung der Viskosität durch Zugabe von 2 % (w/w) Carboxymethylcellulose
- 0,9 % (w/w) Natriumalginatlösung
- Vernetzungszeit 15 min
- zweifach kurz mit Leitungswasser waschen
- für 10 min in 1 % (w/w) Calciumchloridlösung aushärten

Bei einem Durchsatz von 3,5 mL/min wurden so 100 Perlen pro Minute gebildet, die einen Durchmesser von ca. 4 mm und eine Wanddicke von 300 μm aufwiesen, wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist. Durchschnittlich konnte jede Kugel mit einer Kraft von 8 N belastet werden, bevor sie zerplatzte.

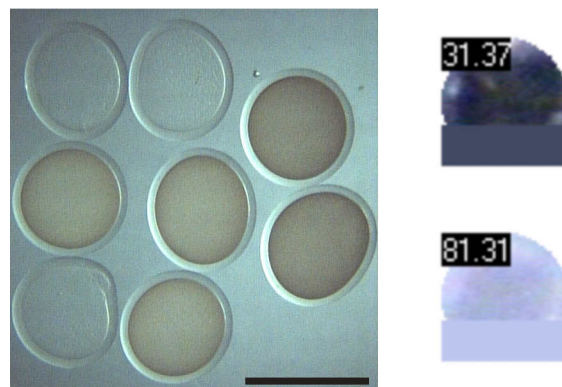


Abbildung 3.1: Sterile und bewachsene Hohlkugeln (nach Inkubation von 24 h), der schwarze Balken entspricht einer Länge von 5 mm (links); Wiedergabe der Bewertung durch die CCD-Kamera einer leeren Perle (rechts oben, Helligkeitsintensität 31,37 %) und eines bewachsenen Mikrobioreaktors (rechts unten, 81,31 %), wobei der Balken im unteren Viertel der Perle jeweils die durchschnittliche Helligkeit wiedergibt, wie sie vom Programm berechnet wird.

Die Perle links unten in Abbildung 3.1 weist eine Fehlstelle auf, die durch den Einschluss einer Luftblase in die eingetropfte Calciumchloridlösung entstanden ist. Derartige Fehlstellen konnten nicht vollständig verhindert werden, es wurden jedoch keine negativen Konsequenzen auf die Stabilität der Perlen während der Inkubation beobachtet.

Die eingeschlossenen Zellen waren in der Lage, sich innerhalb der Mikrobioreaktoren zu vermehren. Nach Inkubationszeit von 24 h in JIM5-Medium (siehe Abschnitt B.6.3 auf Seite 112) ließen sich bewachsene (getrübte) und weiterhin sterile (durchsichtige) Perlen bereits makroskopisch deutlich voneinander unterscheiden.

Mithilfe des speziellen Vorsatzes für die Pipettierspitze des RSP9652 konnten die Perlen aus dem konstruierten Fangkorb angesaugt und einzeln abgelegt werden. Die CCD-Kamera war in der Lage, ohne zusätzliche Vergrößerungseinheit die Perlen ausreichend groß darzustellen und eine elektronische Beurteilung zu ermöglichen. Die sterilen Perlen erschienen dabei auf dem Monitor als schwarze Objekte, da sie einfallendes Licht nahezu ungestört durchlassen. Bewachsene Hohlkugeln hingegen brechen bzw. reflektieren das Licht und für die Kamera erschienen sie milchig trübe.

Um dieses Verhalten in einen auswertbaren Zahlenwert zu fassen, wurden folgende Berechnungen durchgeführt: Der die Perle umfassende Bildausschnitt wurde zunächst einmalig in dem Dialog **TCCDEditSettingsDialog** als ROI („region of interest“) definiert. Zur Bildauswertung wurde dann für die drei Grundfarben rot, grün und blau der RGB-Palette jeweils der Mittelwert über alle Bildpixel des ROIs berechnet. Da jede der Farben nur Zahlenwerte zwischen 0 und 254 annehmen kann, lässt sich die einzelne Farbsättigung als Prozentwert angeben und damit als Mittelwert der drei Prozentwerte auch eine Gesamtsättigung. Diese wird als Zahlenwert wie auch ein mit der sich aus den drei mittleren Farbwerten ergebende RGB-Farbe gefülltes Rechteck zur Kontrolle auf dem Bildschirm ausgegeben.

Die als Prozentwert ausgegebene Farbsättigung und damit Helligkeitsintensität lag für unbewachsene Mikrobioreaktoren deutlich unter 50 %, für positive Perlen erreichte sie Werte zwischen 75 und 100 %. Eine eindeutige optoelektronische Unterscheidung und die Sortierung durch das Programm „Screening-of-Microbeads“ waren daher möglich.

In Vials mit frischem JIM2-Medium und gewaschenen bewachsenen Perlen konnte nach der sekundären Einzelinkubation unter Verwendung des aufgebauten Autosamplers Produktbildung im Falle von eingeschlossenen DFA-III-Bildnern (siehe Abschnitt 5.7) nachgewiesen werden. Auch ein getrübter Überstand über der Perle führte zu keiner Beeinflussung der Messung durch Säulenverstopfung, da der eingebaute Inline-Filter die Partikel zurückhielt.

3.3 Bewertung der einzelnen Automatenkomponenten

Bei der Beurteilung der einzelnen Geräte musste grundsätzlich zwischen den auf dem OEM-Markt gekauften (halb)fertigen Produkten und den im Rahmen der Arbeit konstruierten Elementen unterschieden werden.

3.3.1 RSP-Automat, Pumpen, CCD-Kamera, Scanner, Schaltventil

Die genannten Komponenten arbeiteten entsprechend ihrer vorgegebenen Normen und eigneten sich für die Aufgaben, für die sie ausgewählt worden waren. Besonders der RSP-Automat erwies sich als sehr robust und zugleich vielseitig. Mit einer Bewegungsgeschwindigkeit von bis

zu 890 mm/min war er in der Lage, auch aufwändige Pipettierarbeiten in einem akzeptablen Zeitrahmen abzuarbeiten.

3.3.2 Eigenkonstruktionen und ihre Ansteuerung

Sämtliche Eigenbauten wurden über den Digital-Ausgang der PCL-812-PG-Karte angesteuert, wobei eine Optokoppler- und diverse Relaisplatinen für die Anbindung verwendet wurden. Es zeigte sich, dass dieses System trotz der Verwendung geschirmter Kabel und der Parallelschaltung großer Kondensatoren nicht völlig störunanfällig war. Wurden in der Nähe andere Großgeräte betrieben oder die Druckluftschaftventile in sehr schneller Folge geschaltet, so traten unsystematisch Fehlschaltungen auf. Diese äußerten sich z. B. durch das selbstständige Ein- und sofortige wieder Ausschalten eines Relais.

Die Horizontalbewegungen der Verfahrstrecke und des Autosamplers wurden über Schrittmotoren und Zahnstangen realisiert. Es zeigte sich, dass diese Kombination mit den zur Verfügung stehenden Möglichkeiten nicht ausreichend exakt positioniert werden konnte, da ein zu großer Totgang zu beobachten war. Deshalb mussten alle wichtigen Positionen über die Abfrage zusätzlicher (End)lagenschalter kontrolliert werden. Außerdem waren die resultierenden Bewegungsgeschwindigkeiten sehr gering.

Aufgrund der geschilderten Probleme wurde von einer Realisierung der in Abbildung 2.3 auf Seite 11 vorgesehenen Peripherie Abstand genommen, da nicht damit zu rechnen war, die Vorratslager für Vials und Spitzen bzw. den Inkubationsraum, der in Form eines Hochregallagers geplant war, auf Basis der vorhandenen Ansteuerhardware aufbauen zu können.

3.3.3 Vereinzelung der Perlen

Die Vereinzelung der Perlen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben durch ein Herausfischen aus dem Vorlagegefäß. Es handelt sich hierbei um einen statistischen Vorgang, dessen Ergebnis von der Anzahl der verbliebenen Perlen abhängig ist. Zu Beginn förderte jeder Hebevorgang Perlen und das Ansaugen durch den Vorsatz des RSP-Automaten war erfolgreich. Bei abnehmender Perlenmenge in der Vorlage war wie erwartet zu beobachten, dass sich in dem Fangkorb immer häufiger keine Perle befand.

Die Sequenz aus den Einzelschritten Eintauchen und Herausheben des Fangkorbes, Ansaugen einer Perle, Transport zur CCD-Kamera, Ablegen vor dem Objektiv, Bewertung der Trübung, die für jede einzelne Perle durchgeführt werden musste, ist trotz Automation zeitintensiv. Befindet sich in der Gesamtheit der zu untersuchenden Perlen nur ein geringer Anteil an getrübbten Mikrobioreaktoren, so wird die Aussortierung der bewachsenen Perlen zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Besonders vor dem Hintergrund einer ungenauen Abschätzung

der Keimzahl und der gleichzeitigen Forderung nach Verkapselung von Einzelzellen, um Rein-kulturuntersuchungen durchführen zu können, ist die Einzelperlenbetrachtung an diesem Ver-fahrensschritt als sehr kritisch zu bewerten.

3.3.4 Eignung der entwickelten Software

Der konsequente Einsatz eines modularen Aufbaus der Software führte dazu, dass das Pro-gramm „Screening-of-Microbeads“ alle geforderten Aufgaben wie gewünscht abarbeiten konn-te. Die Kommunikation zwischen den drei Programmsäulen verlief bei allen Aufgaben rei-bungslos. Sollten in der Zukunft weitere Hardwarebauteile unterstützt werden müssen, sind für diese lediglich die passenden Delphikomponenten zu erstellen, um sie vollständig in das Programm integrieren zu können.

3.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass es nicht gelungen ist, einen vollständigen Screeningdurchgang autark durchzuführen, obwohl alle einzelnen Komponenten des entworfe-nen Automaten funktionierten und ihre Aufgabe(n) erledigten. Folgende Gründe sind hierfür anzuführen:

- Die im Bereich des Automaten erreichbare Sterilität ist unzureichend.
- Da es an peripheren Vorrats- und Versorgungseinrichtungen mangelte, musste regelmäßig durch den Anwender eingegriffen werden, um Pipettenspitzen (ein Kasten enthält 96 Spit-zen) bzw. Trays von HPLC-Vials oder -Kappen (jeweils zusammen nur 24 Stellplätze) bereitzustellen bzw. nach ihrer Befüllung zu entnehmen.
- Besonders die Verfahrstrecke erwies sich aufgrund ihres langen Weges unter Berücksich-tigung der zuvor genannten Probleme mit den Schrittmotoren als sehr fehleranfällig.

Um das begonnene Projekt erfolgreich zuende führen zu können, bedarf es der folgenden Ände-rungen und Erweiterungen.

- Der gesamte Apparat muss entweder in einem separaten Raum mit leistungsstarken Luft-filtern oder zumindest unter einer Sterilwerkbank aufgebaut werden.
- Anstelle der Eigenbauten sind fertige Komponenten zu verwenden. Besonders die Schritt-motoreinheiten sind durch gekapselte Linearmodule zu ersetzen.

- Um eine reibungslose Kommunikation mit diesen Modulen zu gewährleisten, sollten sie über eine RS232-Schnittstelle angesprochen werden können, deren Einsatz sich bewährt hat.
- Die jetzige zweiarmige Zentraleinheit sollte durch einen Roboterarm mit wenigstens fünf Freiheitsgraden ersetzt werden. Geeignete Modelle finden sich z. B. in der MoveMaster-Serie (Mitsubishi Electric Corp., Tokyo, Japan) oder der TurboScara-Reihe (Robert Bosch GmbH, Gerlingen). Dieses Robotersystem würde alle Arbeiten, die sich nicht mit der einzelnen Perle bzw. dem einzelnen Vial beschäftigen, übernehmen.

Zur Steigerung des Durchsatzes ist es außerdem erforderlich, eine Methodik zu entwickeln, wie die Perlen im Durchflussverfahren hinsichtlich Bewuchs bzw. Trübung und ggf. bestimmter Inhaltsstoffe analysiert werden können. Für diese Alternative zu der bisher verwendeten Einzelperlenmanipulation reicht jedoch kein gewöhnliches Durchflusszytometer, da Vorkehrungen getroffen werden müssen, positive Perlen aus dem kontinuierlichen Strom der Perlen herausnehmen und weiterbearbeiten zu können. Alternativ zu den derzeit verwendeten Vials könnte eine Weiterverarbeitung/Inkubation auch direkt in den schon angesprochenen Mikrotiterplatten erfolgen, wenn die äußeren Bedingungen ausreichend aseptisch gehalten werden.

Geht man davon aus, dass unter 100 bewachsenen Perlen nur eine positive zu finden ist, so benötigt man nach dem Verfahren der Einzeluntersuchung bis zu 100 Untersuchungen. Schneller führt eine Strategie zum Ziel, die in der Informatik unter dem Namen „Divide and Conquer“ bzw. nach dem lateinischen Original „divide et impera“ (**CAESAR, 56 BC**) bekannt ist. Die ursprüngliche Gesamtheit an Perlen wird in zwei gleichgroße Gruppen unterteilt, die zunächst untersucht werden. Jede Gruppe mit einem positiven Resultat wird dann erneut geteilt und wieder untersucht. Am Ende sind nur zwei Ansätze mit je einer einzigen Perle zu untersuchen. Im Falle der 100 Perlen sind insgesamt nur sieben mal zwei Untersuchungen erforderlich, um eine positive herauszufinden (1: je 50; 2: je 25; 3: je 12 bzw. 13; 4: je 6 bzw. 7; 5: je 3 bzw. 4; 6: je 2; 7: je 1 Perle). Das Handling der hierfür erforderlichen sehr unterschiedlichen Inkubationsgefäße ist mit der derzeitigen Hardware jedoch nicht möglich.

Insgesamt wurde gezeigt, dass auf Basis von in Hohlkugeln verkapselten Zellen ein Screening grundsätzlich möglich ist. Sollten die aufgeführten Veränderungen und Ergänzungen realisiert werden, wird eine vollständige Automatisierung möglich.

Das Grundgerüst des entwickelten Delphi-Programmes kann darüber hinaus auch für andere Zwecke der Laborautomatisierung eingesetzt werden. Durch die Verwendung gekapselter Komponenten entbindet es den Anwender von der direkten Kommunikation mit den Hardwarebauteilen und stellt ihm stattdessen eine bequeme Programmierungsumgebung zur Verfügung.

Kapitel 4

Difructoseanhydrid III (DFA III) – Einleitung und Stand der Forschung

4.1 Fructane, Fructooligosaccharide und Inulin

Fructane bezeichnen Kohlenhydrate, die im Wesentlichen aus dem Baustein D-Fructose bestehen. Im Gegensatz zu den Glucanen, die eine Kettenlänge von mindestens zehn Monosacchariden haben müssen, zählen hierzu auch kürzere Polymere (Fructooligosaccharide, FOS), sofern sie hauptsächlich aus Fructoseeinheiten aufgebaut sind. Es werden aufgrund der historischen Entwicklung z. T. unterschiedliche Nomenklaturen und Spezialnamen verwendet (SUZUKI, 1993). Abbildung 4.1 zeigt die Strukturformeln für einige Verbindungen.

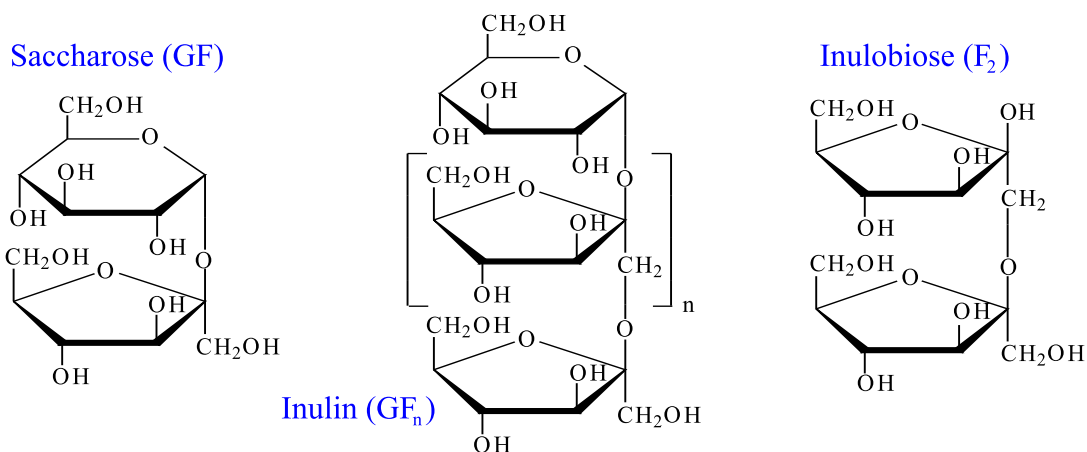


Abbildung 4.1: Chemische Struktur von Saccharose, Inulin und Inulobiose; bei den Fructooligosacchariden ergibt sich für $n=1$ die Verbindung 1-Kestose, für $n=2$ Nystose.

Ausgehend vom Verknüpfungstyp werden zwei lineare Fructane unterschieden: Inuline mit β -(2→1)-Bindungen (benannt nach der Pflanze *Inula helenium*, Echter Alant bzw. Helenenkraut) und Levane mit β -(2→6)-Bindung. Inuline haben an ihrem reduzierenden Ende eine terminale

Glucoseeinheit, die entsprechend der Bindung in der Saccharose α -(2 \rightarrow 1)-verknüpft ist, bei den Levanen fehlt diese zumeist.

4.1.1 Speicherstoff Inulin

Inulin ist als Speicherstoff in ca. 30.000 Pflanzenarten (*sic!*) enthalten, vorwiegend Mitgliedern der *Compositae*, der *Liliaceae* und der *Alliaceae* (HENDRY & WALLACE, 1993). Während die erste Familie u. a. durch Topinambur, Dahlie und die Wurzelzichorie vertreten ist, umfassen die beiden anderen die aus der heimischen Ernährung bekannten Arten Lauch, Knoblauch, Spargel und Zwiebel. Den Gehalt an Inulin einzelner Pflanzenarten listet Tabelle 4.1 auf, in Tabelle 4.2 sind die wichtigsten europäischen Inulinproduzenten aufgeführt.

Tabelle 4.1: Übersicht über den Inulingehalt verschiedener Pflanzenarten (Auswahl)

Trivialname	Lateinischer Name	Gehalt (TS)
Wurzelzichorie	<i>Cichorium intybus</i> L. var. <i>sativum</i>	81 %
Topinambur, „Jerusalem Artichoke“	<i>Helianthus tuberosus</i> L.	75 %
Dahlie	<i>Dahlia variabilis</i>	68 %

(FUCHS, 1991; FREESE, 1993)

Tabelle 4.2: Übersicht europäischer Inulinproduzenten

Firmenname	Firmensitz	Markennamen
Cosucra S. A.	Fontenoy, Belgien	Fibruline [®] , Fibrulose [®]
Raffinerie Tirlemontoise S. A.	Tienen, Belgien	Raftilose [®] , Raftiline [®]
Sensus Operations	Roosendaal, Niederlande	Frutafit [®]

4.1.2 Inulinsynthese in Pflanzen

Ein Modell für die Biosynthese von Fructooligosacchariden wurde erstmals von EDELMAN und JEFFORD für Topinambur beschrieben (EDELMAN & JEFFORD, 1968). Durch das Zusammenspiel der Enzyme Saccharose-Saccharose-Fructosyltransferase (SST, EC 2.4.1.99) und Fructan-Fructan-Fructosyltransferase (FFT, EC 2.4.1.100) werden entsprechend Abbildung 4.2 Fructoseeinheiten von Saccharose auf Saccharose bzw. von Fructooligosacchariden auf die wachsende Inulinkette übertragen. Dieser Schritt reguliert die Länge der gebildeten Oligomere. Abhängig von der betrachteten Pflanze treten Variationen zu dem Modell auf, in Spargel beispielsweise werden (2 \rightarrow 6)-Abzweigungen über das Enzym 6-FFT (Fructan-Fructan-6-Fructosyltransferase) gebildet (SHIOMI, 1989).

Durch gentechnische Arbeiten soll diese Biosynthese auch in anderen Pflanzen etabliert werden, um Inulin in Feldfrüchten anbauen zu können, für die eine perfekte Anbau- und Erntetechnik

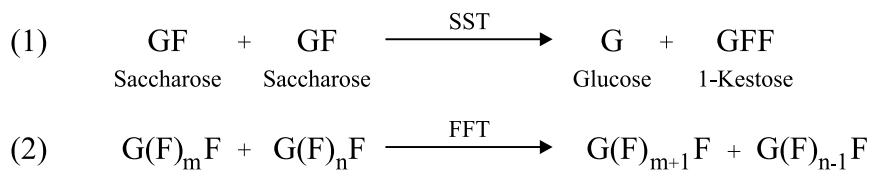


Abbildung 4.2: Modell der Biosynthese von Fructooligosacchariden in *Helianthus tuberosus*.

bei hohen Erträgen zur Verfügung steht. Zu nennen sind hier Arbeiten, bei denen SST aus Topinambur in der im Vergleich zur Zichorie besser zu erntenden Zuckerrübe exprimiert wurde und niedermolekulare Fructane bis GF₄ gebildet wurden (SEVENIR *et al.*, 1998), oder die Produktion von FOS in Kartoffelknollen (VAN DER MEER *et al.*, 1994; HELLWEGE *et al.*, 1997). Bei beiden Ansätzen gibt es jedoch noch erhebliche Probleme zu lösen.

4.1.3 Technische FOS-Produktion

Neben dieser *in-vivo*-Produktion werden Fructooligosaccharide auch *in vitro* enzymatisch aufgebaut. 1984 begann die japanische Firma Meiji Seika mit der Produktion von FOS. Dort wurde die Fructosyltransferase von *Aspergillus niger* ATCC 20611 zur Produktion des Markenproduktes Neosugar®, einem Gemisch aus Glucose, Saccharose und niedermolekularen FOS, eingesetzt (HIDAKA *et al.*, 1988). Für eine kontinuierliche Prozessführung wurden ganze Zellen von *A. niger* sowie auch an Ionentauscher gebundenes Enzym in Calciumalginat immobilisiert (YUN, 1996).

Neben *A. niger* sind mit *Aurobasidium pullulans* (seit 1990 eingesetzt von der koreanischen Firma Cheil Foods & Chemicals) (JUNG *et al.*, 1987; PATIL & PATIL, 1999), *Fusarium oxysporum* (GUPTA & BHATIA, 1982), *Aspergillus phoenicis* (VAN BALKEN *et al.*, 1991) und *Aspergillus foetidus* (HANG *et al.*, 1995) weitere Mikroorganismen bekannt, die Fructosyltransferasen bilden. Diese mikrobiellen Enzyme sind im Gegensatz zu den pflanzlichen deutlich größer und temperaturstabiler, sodass sie bevorzugt verwendet werden. Im Gegensatz zu dem Modell von EDELMAN und JEFFORD ist ein einziges Enzym in der Lage, ausgehend von Saccharose neben 1-Kestose (GF₂) auch Nystose (GF₃) und Fructosyl-Nystose (GF₄) zu bilden.

Da die nach Reaktion (1) in Abbildung 4.2 freiwerdende Glucose die Reaktion inhibiert, sind Arbeiten zur *in-situ*-Eliminierung dieses Nebenproduktes durchgeführt worden. Eine Möglichkeit ist die gleichzeitige Umsetzung zu Gluconsäure durch das Enzym Glucoseoxidase und ihre Abtrennung durch Ionentauscher (YUN & SONG, 1993).

4.1.4 Enzymatische Reaktionen an Fructanen

Der Abbau von Inulinen wird von pflanzlichen und mikrobiellen Enzymen katalysiert; die entsprechenden Reaktionen sind in Abbildung 4.3 dargestellt. In Topinambur spaltet das Enzym

Fructan-Exohydrolase (FEH, EC 3.2.1.80) entsprechend Reaktion (1) endständige Fructoseeinheiten ab, die hierbei letztendlich gebildete Saccharose (GF) wird nach Reaktion (2) durch Invertase (EC 3.2.1.26) zu den Bausteinen Glucose und Fructose hydrolysiert (EDELMAAN & JEFFORD, 1968; RUTHERFORD & DEACON, 1972). Das zur FEH analoge Enzym der Mikroorganismen wird allgemein Exoinulase I genannt und ist besonders bei Pilzen verbreitet (UCHIYAMA, 1993).

Manche Mikroorganismen wie z. B. *Pseudomonas* sp. No. 65 bilden außerdem Enzyme (Endoinulase I, 3.2.1.7), die gemäß Reaktion (3) eine Spaltung innerhalb der Fructosekette katalysieren und so Oligofructosen ohne endständige Glucose freisetzen (NAKAMURA *et al.*, 1977; KIM *et al.*, 1997). Abhängig vom Organismus weisen diese Endoinulinasen teilweise auch Exoinulase- bzw. Invertaseaktivität auf. Die abgespaltenen Oligosaccharide haben einen Polymerisationsgrad von DP2 bis DP7, hauptsächlich werden jedoch Inulobiose (F_2) bis F_4 beobachtet (YUN *et al.*, 1999).

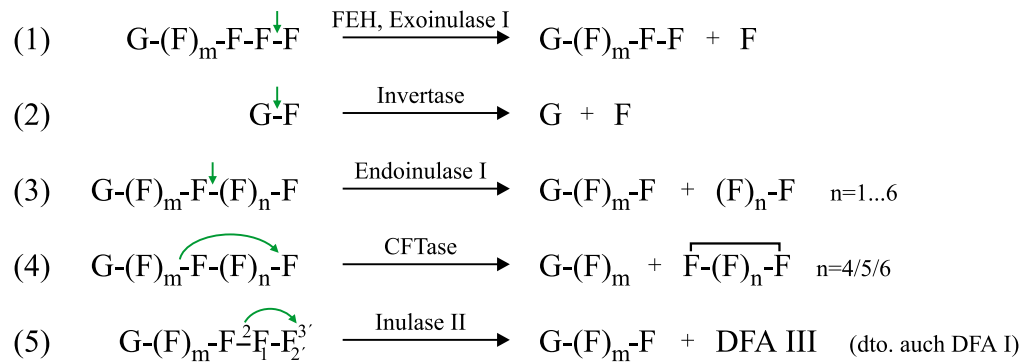


Abbildung 4.3: Reaktionswege des enzymatischen Abbaus von Inulin (die für die Hydrolyse benötigten Wassermoleküle sind nicht mit aufgeführt; weitere Erklärungen zu den einzelnen Enzymen im Text).

Neben diesen hydrolytischen Enzymen gibt es zwei verschiedene Transferasen, die Inulin umsetzen. Die Cycloinulooligosaccharid-Fructotransferase (CFTase, EC 2.4.1.–¹) wird von *Bacillus circulans* OKUMZ 31B exprimiert und bildet nach Reaktion (4) cyclische β -(2→)1-Fructane mit sechs, sieben oder acht Untereinheiten (KAWAMURA & UCHIYAMA, 1989). Im Gegensatz zu den vergleichbaren Cyclodextrinen, die in ihrem hydrophoben Kern neutrale Moleküle binden können (TAKAI *et al.*, 1994), hat CF6 (Cycloinulohexaose) Kronenether-Struktur (SAWADA *et al.*, 1990) und kann lediglich Ionen wie z. B. K^+ , Ba^{++} oder Cs^+ aufnehmen. Auch Modifizierungen wie eine Methylierung der Hydroxylgruppen (TAKAI *et al.*, 1994) oder die Anbindung weiterer Fructosen in 6-Stellung durch Levansucrase (KUSHIBE *et al.*, 1996) ändern dieses nicht.

Weitere Abbauprodukte des Inulins sind zwei über das Enzym Inulase II ² gemäß Reaktion (5) zugängliche Difructosedianhydride. Abhängig von der Position der zweiten Bindung werden

¹Die Benennung CFTase wurde von (KAWAMURA & UCHIYAMA, 1993) übernommen, eine vollständige EC-Nummer wurde noch nicht vergeben.

²Dieses Enzym wird auch unter dem Namen Inulinfructotransferase beschrieben.

DFA I (Di-D-Fructofuranose-2',1:2,1'-dianhydrid, gebildet durch EC 2.4.1.200) und DFA III (Di-D-Fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid, EC 2.4.1.93) unterschieden. Da diese Arbeit sich wesentlich mit dem letztgenannten Enzym beschäftigt, wird die Verbindung DFA III separat in Abschnitt 4.3 auf Seite 49 behandelt.

4.2 Anwendungen für Inulin und Fructooligosaccharide

Der Einsatz von Zuckerstoffen in der chemischen Industrie als Alternative zu erdölbasierten Rohstoffen gewinnt vor dem Hintergrund begrenzter fossiler Vorräte zunehmend an Bedeutung. Daher finden Fructane auch Anwendung im Non-Food-Bereich, ihr hauptsächliches Marktsegment haben sie jedoch weiterhin in der Nahrungsmittelindustrie.

4.2.1 Anwendungen im Non-Food-Bereich

Aufgereinigte, langkettige oder verzweigte Inulinmoleküle werden in der medizinischen Diagnostik zur Untersuchung der Nierenfunktion eingesetzt. Intravenös injiziertes Inulin verläßt den Körper unverändert ohne Rückresorption in den Nieren (EIGNER *et al.*, 1988). Ein hierauf basierendes Testkit wird unter dem Handelsnamen Inutest® (Laevosan GmbH, Linz, Österreich) angeboten.

Carboxylierte Inuline wie Dicarboxyinulin (DCI) oder auch Carboxymethylinulin (CMI) sind calciumkomplexierend und können als Ersatz für die bisher in Waschmitteln verwendeten Polyacrylate eingesetzt werden (RAAIJMAKERS *et al.*, 1997). Unter dem Handelsnamen CARBOXYline werden diese Inulinderivate von der Firma Cosun (Roosendaal, Niederlande) für verschiedene Branchen angeboten (COSUN, 2000). In weiter funktionalisierter Form (Sulfonierung oder Aminierung) ist die Chelateigenschaft ausreichend für die Entfernung von Schwermetallen aus kontaminierten Böden (BOGAERT & SLAGHEK, 1997). Im Gegensatz zu dem häufig verwendeten Chelatbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) können diese Produkte auch in technischem Maßstab angewendet werden, da sie weniger persistent in der Umwelt sind.

Werden Inuline mit heißschmelzenden Weichmachern erhitzt, bilden sich Heißkleber, die sich für Papier und Aluminium eignen und daher in der Verpackungsindustrie ein Einsatzgebiet finden (VAN LEEUWEN *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu Klebersystemen, die auf Stärke oder Dextrinen beruhen, kommen sie ohne Wasser als Lösungsmittel aus und entsprechend schnell tritt die gewünschte Klebewirkung ein.

Die Veretherungsprodukte der Reaktion vorzugsweise langkettiger Inuline mit Epoxiden eignen sich als Weichmacher für Thermoplaste, als Emulgatoren oder auch als Schlichtematerialien für die Textilindustrie. Die Verwendung entsprechender Inulinderivate und ein Verfahren zu ihrer

Herstellung wurden 1993 von der Firma Südzucker AG (Mannheim) zum Patent angemeldet (KUNZ & HAJI BEGLI, 1993).

Die in den 80er Jahren attraktiv erscheinende Hydrogenolyse von Inulinen an CuO-CeO₂-SiO₂-Katalysatoren zur Herstellung von Polyolen – hauptsächlich zu Glycerin – hat ihre ursprüngliche Attraktivität verloren (FUCHS, 1987). Glycerin wird zur Zeit preiswerter bei der Hydrolyse von Fetten und Ölen gewonnen.

Weitere chemische Reaktionsprodukte aus Inulin sind über die Zwischenstufe 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) zugänglich. HMF kann aus Inulin bzw. Fructose durch sauer katalysierte Dehydratisierung gewonnen werden (KUSTER, 1990), ist jedoch unter diesen Bedingungen sehr instabil und bildet leicht Lävulin- und Ameisensäure. Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich daher mit der *in-situ*-Derivatisierung des HMFs an Edelmetallkatalysatoren über Furandialdehyd zu dem Oxidationsprodukt Furandicarbonsäure (VINKE *et al.*, 1990; KRÖGER, 2000). Dieses eignet sich als Polyesterkomponente für Werkstoffe, Farben und Lacke.

Durch säurekatalysierte Umsetzung von Fructose oder DFA III mit langkettigen Alkoholen können Alkylfructoside synthetisiert werden, die aufgrund ihrer Grenzflächenaktivität als nicht-ionische Tenside einsetzbar sind (DE GOEDE *et al.*, 1991; BUCHHOLZ, 2000). Vergleichbare Eigenschaften sind von den Alkylpolyglykosiden (APG) bekannt, die bereits Bedeutung im Detergentienbereich haben.

Neben der chemischen Derivatisierung sind zahlreiche Arbeiten zur Biokonversion von Inulin im Non-Food-Bereich durchgeführt worden. So lassen sich Aceton und Butanol mithilfe von *Clostridium acetobutyricum* oder *C. pasteurianum* direkt aus Inulin gewinnen (OIWA *et al.*, 1987). Auch die Vergärung zu Lactat (RICHTER, 1999) oder 2,3-Butandiol (FAGES *et al.*, 1986) ist möglich, das Hauptforschungsgebiet war und ist jedoch die Ethanolproduktion.

Bestimmte Stämme von *Kluyveromyces marxianus* führen die Hydrolyse der Inulinkette und die alkoholische Gärung in einem Ein-Schritt-Prozess durch (BAJPAI & BAJPAI, 1989). Soll das aus der Bioalkoholgewinnung aus Melasse bekannte Bakterium *Zymomonas mobilis* eingesetzt werden, muss die Hydrolyse separat durchgeführt werden. Eine Co-Immobilisierung der Inulase I aus *A. niger* hat hier Vorteile gegenüber der sauren chemischen Spaltung (KIM & RHEE, 1990). Für Topinambur liegt die maximale Produktivität bei ca. 10.000 L Ethanol pro Hektar und Jahr (BAJPAI & BAJPAI, 1989).

Zukünftige Entwicklungen im Preisgefüge der konkurrierenden Petrochemie und die speziellen Eigenschaften neuer, auf Inulinderivaten basierender Verbindungen entscheiden darüber, welche Produkte sich am Markt durchsetzen können. Mit einem Weltmarktpreis von ca. 1,40 Euro pro Kilogramm (PABST, 2000) ist Inulin selbst im Bereich der nachwachsenden Rohstoffe ein sehr teurer Grundstoff, dessen Verwendung nur bei der Herstellung hochwertiger Produkte wirtschaftlich sein kann.

4.2.2 Inulin und FOS in der Ernährung

Bereits 1868 entstand motiviert durch hohe Einfuhrzölle auf Kaffeebohnen ein aus gerösteten und gemahlenen Zichorienwurzeln hergestelltes Kaffeesurrogat, das sich heute unter den Namen „Landkaffee“ bzw. „Muckefuck“ wieder zunehmender Beliebtheit erfreut (UNIFRANCK, 2000).

Eine weitere in Mittelamerika wichtige Verwendung findet Inulin bei der Herstellung des Nationalgetränkes Tequila. Zu diesem Zweck werden jährlich 20.000 ha Agaven (*Agave azul tequilana*) angebaut, der Saft mit *Kluyveromyces marxianus* vergoren und anschließend destilliert (FUCHS, 1991).

Für die direkte Verwendung von Inulin und daraus abgeleiteter Verbindungen im Lebensmittelbereich sprechen zwei Gründe:

- Fructose als wesentlicher Baustein des Inulins hat in 10 %iger Lösung bei gleichem Kaloriengehalt ca. 170 % der Süßkraft von Saccharose (YUN, 1996). Sie ist gerade bei niedrigen Temperaturen sehr gut wasserlöslich und ist neben einer geschmacksverstärkenden Wirkung in der Lage, Bitterkeit in Nahrungsmitteln zu überdecken. Da sie im Gegensatz zur Glucose insulinunabhängig vom Körper metabolisiert wird, eignet sie sich besonders für Diabetikernahrung.
- Fructooligosaccharide weisen nur maximal ein Drittel der Süßkraft von Saccharose auf, werden jedoch als Ballaststoff durch die menschlichen Verdauungsenzyme nicht hydrolysiert. Sie haben einen stimulierenden Effekt auf die Darmflora, wo sie besonders das Wachstum von Bifidobakterien anregen (YAZAWA *et al.*, 1978) und gleichzeitig inhibitorisch gegenüber potenziell pathogenen Organismen wie Clostridien und *E. coli* wirken (WANG & GIBSON, 1993).

Während die Fructosegewinnung aus Stärke über Hydrolyse und anschließende Glucoseisomerisierung verläuft („High Fructose Corn Syrup“, HFCS), reicht bei der Verwendung von Inulinen eine reine Hydrolyse des Polymers. Diese kann entweder chemisch auch ohne HMF-Bildung an z. B. zeolithischen Katalysatoren durchgeführt werden (ABASAEED & LEE, 1995), für die im Handel befindlichen Produkte werden aber Gemische der in Abbildung 4.3 beschriebenen Enzyme Endo- und Exoinulase I verwendet. Ein entsprechendes Produkt wird z. B. von der Firma Raffinerie Tirlemontoise S. A. (Tinen, Belgien) unter dem Handelsnamen Raftisweet® angeboten (LEENHEER, 1996).

Durch die gewöhnliche Nahrungsaufnahme nimmt ein EU-Bürger täglich durchschnittlich bereits 12 g Fructane zu sich (TIRLEMONTTOISE, 1990). Die oben ausgeführten Vorteile einer FOS-reichen Ernährung haben in den letzten Jahren zu der gezielten Anreicherung von Lebensmitteln mit diesem Ballaststoff geführt. Seine Herstellung kann entweder wie oben für Neosugar® beschrieben durch den Aufbau ausgehend von Saccharose erfolgen oder aber die

aus den Anbaufrüchten gewonnenen langkettigen Inuline werden enzymatisch in die gewünschten Oligomere überführt. Die koreanische Arbeitsgruppe um YUN hat sich intensiv mit diesem Thema beschäftigt. Eine von *Pseudomonas* sp. exprimierte Endoinulase wurde erfolgreich in immobilisierter Form (Polystyrolträger) eingesetzt (YUN *et al.*, 2000) und inzwischen auch in *E. coli* kloniert (YUN *et al.*, 1999). Auch *Xanthomonas* sp. (PARK *et al.*, 1999) und *Streptomyces rochei* E 87 bilden dieses Enzym, letzteres ist so selektiv, dass es hauptsächlich Inulotriose (F₃) bildet (YOKOTA *et al.*, 1995). Nach diesem Verfahren der partiellen Hydrolyse werden beispielsweise ebenfalls von Raffinerie Tirlemontoise S. A. (Markenname Raftilose®) oder der Firma Cosucra S. A. (Fontenoy, Belgien, Markenname Fibruline®) Oligofructosesirups aus dem Inulin der Wurzelzichorie hergestellt. Der Bereich der Fructooligosaccharide innerhalb der Südzucker AG weist im Moment zweistellige Zuwachsraten auf, ein Trend, dessen Fortsetzung auch für die kommenden Jahre erwartet wird (SPETTMANN, 2000).

Neben den Oligofructosen des Inulintyps mit β -(2→1)-Verknüpfungen wächst außerdem das Interesse an Polymeren des Levantyps, also mit β -(2→6)-Bindung und an den kurzkettigen Neoverbindungen (MARX *et al.*, 2000), da diesen ebenfalls prebiotische Effekte zugeschrieben werden.

4.3 Einsatz als Zuckeraustauschstoff

Süß schmeckende Lebensmittel haben für den Menschen eine große Bedeutung und daher ist „Zucker“ ein wichtiger Rezeptbestandteil bei der häuslichen Zubereitung und bei der industriellen Lebensmittelherstellung. Seit Jahrzehnten wird versucht, geeignete Alternativen zur Verwendung von Saccharose („Tafelzucker“, in unseren Breiten zumeist aus Rüben gewonnen) zu finden. Zur Zeit der Weltkriege wurde dies durch die allgemeine Knappheit an Zucker motiviert, heutzutage werden mit dem Konsum von Zucker einige der sogenannten Zivilisationskrankheiten verbunden. Diese Zusammenhänge sind teilweise wissenschaftlich belegt (z. B. die Ausbildung von Karies), zum Teil unterliegen sie aber auch nur der öffentlichen Meinung. Die Ausbildung von Fettleibigkeit z. B. wird deutlich stärker durch den Fettverzehr beeinflusst als durch Kohlenhydrate (PUDEL, 1996).

4.3.1 Zuckerstoffe, Süßstoffe und Zuckeraustauschstoffe

Die süßenden Stoffe werden in drei verschiedene Gruppen unterteilt: Zuckerstoffe, Süßstoffe und Zuckeraustauschstoffe. Saccharose fällt hierbei zusammen mit den anderen verwendeten Disacchariden Maltose (Malzzucker) und Lactose (Milchzucker) und dem Monosaccharid Glucose (Traubenzucker) bzw. den aus der Hydrolyse von Stärke gewonnen Glucosesirups in die Kategorie Zuckerstoffe. Bei der Zubereitung von Lebensmitteln tragen sie nicht nur zum süßen Geschmack bei, sondern zeigen in hoher Konzentration aufgrund der dann herabgesetzten

Wasseraktivität auch eine stark konservierende Wirkung (Marmeladen und Gelees, Bonbons). Abhängig von der Zubereitung bestimmen sie die Textur von Süßigkeiten, ermöglichen den Einsatz fermentativer Herstellungsverfahren („gehen“ von Teigen, Vergärung) und haben außerdem Einfluss auf den Geruch und die Kruste von Backwaren. Weiterhin bauen viele Rezepte auf die körpergebende Wirkung von Saccharose auf.

Im Gegensatz hierzu sind Süßstoffe in der Regel vielfach süßer als Saccharose und müssen in wesentlich geringeren Konzentrationen zugesetzt werden. Sie haben daher entweder auch nur einen unbedeutend geringen kalorischen Wert oder werden gar nicht metabolisiert und unverändert wieder ausgeschieden. Weiterhin haben Süßstoffe keine kariogene Wirkung und sind auch für diätetische und Diabetikerlebensmittel geeignet. Die bekanntesten Süßstoffe sind Saccharin, Aspartam und Cyclamat.

Zumeist werden Kombinationen verschiedener Zuckeraustauschstoffe eingesetzt, um einen möglichst zuckerähnlichen Geschmack zu erreichen. Das bekannte Markenprodukt Natreen® besteht z. B. aus Cyclamat, Saccharin und Thaumatin (SARA LEE, 2000).

Ist neben der süßenden Wirkung auch signifikante Substanz erforderlich, müssen die Süßstoffe durch geeignete Zuckeraustauschstoffe ergänzt werden. Fructose zählt zu den Zuckeraustauschstoffen, weitere Vertreter sind zumeist nichtkariogene Zuckeralkohole, die eine im Vergleich zu Saccharose geringere Süßkraft haben. Da ihre Metabolisierung ohne das Hormon Insulin verläuft, sind sie gerade für Diabetiker geeignet. In großer Menge aufgenommen haben Zuckeraustauschstoffe zumeist eine abführende Wirkung.

Beispiele bereits verwendeter Verbindungen sind Sorbit, Isomalt (Markenname Palatinit®), Mannit und Xylit. Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich mit zahlreichen weiteren Ersatzstoffen wie z. B. der kalorienfreien D-Tagatose (ROH *et al.*, 2000), dem Erythrit (RÖPER & GOOSSENS, 1993) oder auch dem aus Inulin zu gewinnenden Difructoseanhydrid III (DFA III).

4.3.2 DFA III als neuer Zuckeraustauschstoff

Bereits in den 20er und 30er Jahren wurden Arbeiten zur Bildung von DFA III (α -D-Fructofuranose- β -D-Fructofuranose-1,2':2,3'-dianhydrid, Strukturformel siehe Abbildung 4.4) aus Inulin mit verdünnter Schwefelsäure durchgeführt und als Reviewartikel (MCDONALD, 1947) zusammengefasst. Noch 1993 wurde dem Produkt jedoch keinerlei wirtschaftliche Bedeutung zugemessen (FRENCH & WATERHOUSE, 1993). Neben der Bildung unter Säureeinwirkung tritt DFA III als Pyrolyseprodukt unter wasserabscheidenden Bedingungen auf (DEFAYE *et al.*, 1985), ein entsprechendes Patent wurde 1996 von der University of Montana (Missoula, Montana) angemeldet. Dort werden Ausbeuten von 40 % DFA in einem aus Inulin gewonnenen Karamel beschrieben (RICHARDS, 1996). Weiterhin wurde DFA-Bildung unter den Bedingungen der industriellen Fructosekristallisation beobachtet, wo sie die Kristallisation der eigentlich gewünschten Fructose stört (CHU, 1988).

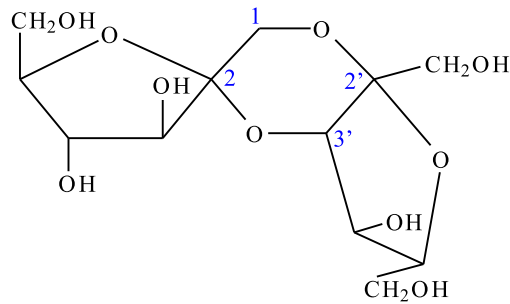


Abbildung 4.4: Chemische Struktur von DFA III.

Wie bereits in Abbildung 4.3 gezeigt, kann DFA III nicht nur chemisch, sondern auch enzymatisch durch Inulase II hergestellt werden. Ein entsprechendes Enzym wurde erstmals von der Arbeitsgruppe um TANAKA und UCHIYAMA 1972 in *Arthrobacter ureafaciens* gefunden und in den folgenden Jahren näher untersucht (UCHIYAMA *et al.*, 1973; UCHIYAMA, 1975A). Inzwischen sind mit anderen *Arthrobacter*-Arten und *Pseudomonas* sp. weitere Organismen isoliert worden, die Inulase II bilden. Eine tabellarische Gegenüberstellung aller bisher beschriebenen Stämme und Enzyme findet sich weiter unten in Tabelle 6.1 auf Seite 77.

Für die Mikroorganismen stellt DFA III eine in die Zelle transportierbare Zwischenstufe beim Inulinabbau dar und wird intrazellulär durch zwei weitere Enzyme über Inulobiose (F_2) in Fructose überführt (TANAKA *et al.*, 1975). Da das inulobiosespaltende Enzym durch Erhitzen selektiv inaktiviert werden kann, ist eine gezielte Produktion von Inulobiose möglich. Das DFA III-spaltende Enzym aus *A. ureafaciens* H65-7 wurde mittlerweile kloniert und fremdexprimiert (SAKURAI *et al.*, 1997A).

DFA III ist ein nichtreduzierender Zucker, der in Wasser gut löslich ist. Der Schmelzpunkt beträgt 162°C , der optische Drehwert $[\alpha_D^{20}]$ $135,6^\circ$. Durch den intramolekularen Dioxanring ist das Molekül sehr stabil, es wird weder von Exoinulase noch von Magensäure hydrolysiert. Es besitzt ungefähr die Hälfte der Süßkraft von Saccharose, ist jedoch nicht kariogen und wird vom Körper nicht metabolisiert. Wie zuvor für Oligofructosen beschrieben hat DFA III als Ballaststoff ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Darmflora. Obwohl bei *in-vitro*-Versuchen von 18 untersuchten typischen Darmbakterien (hauptsächlich Bifidobakterien und Lactobazillen) keiner der Stämme in der Lage war, DFA III zu verwerten, zeigten *in-vivo*-Versuche bei Ratten eine positive Veränderung der Florazusammensetzung (SAITO & TOMITA, 2000). Außerdem wurde eine deutlich erhöhte Calciumaufnahme im Darm von Ratten beobachtet – eine DFA-III-angereicherte Nahrung könnte das Risiko von Osteoporose senken (SUZUKI *et al.*, 1998).

DFA III kann in technischem Maßstab durch die Kombination eines Kationen- und eines Anionentauschers mit nachgeschalteter Kristallisationsstufe aufgereinigt werden. Aus der verbleibenden Mutterlauge können anschließend auf chromatographischem Wege eine weitere DFA-III-reiche und eine FOS-reiche Fraktion gewonnen werden (ZHAO, 1998). Die FOS treten auf, weil die Inulinketten nicht vollständig zu DFA umgesetzt werden können, sondern ein GF_2 -

bzw. GF₃-Rest verbleiben.

Es besteht die Möglichkeit, mit DFA III einen neuen Zuckeraustauschstoff zu produzieren, der aus Feldfrüchten gewonnen wird, die mit bereits etablierter Ackerbautechnik kultiviert werden können (Topinambur parallel zum Kartoffelanbau, Zichorie wie Zuckerrübe). Nach einer enzymatischen Konversion kann durch den Einsatz der hocheffizienten Aufarbeitungstechnik der Zuckergewinnung das Endprodukt raffiniert und in den Handel gebracht werden.

4.4 Prozessführung: Thermophilie und Immobilisierung

Um DFA III unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten auch großtechnisch herstellen zu können, werden bestimmte Anforderungen an das verwendete Enzym und seinen Einsatz gestellt.

4.4.1 Löslichkeit von Inulin und weitere Aspekte

Inulin ist als langkettiges Molekül nur bedingt in Wasser löslich und wird durch heißes Wasser aus den Anbaufrüchten extrahiert. Wird eine Lösung verschieden langer Inulinketten bei mäßiger Temperatur mit Inulinase umgesetzt, so werden nur die in Lösung befindlichen kurzkettigen Moleküle durch das Enzym abgebaut. Ein hierauf beruhendes Verfahren zur gezielten Anreicherung langkettiger Inuline wurde von der Südzucker AG (Mannheim) 1993 zum Patent angemeldet (KUNZ *et al.*, 1993). Es liegt nahe, dass eine möglichst vollständige Konversion von Inulinrohextrakt zu DFA III daher bei erhöhten Temperaturen erfolgen sollte. Die Höhe der Temperatur ist dabei abhängig von der durchschnittlichen Kettenlänge des umzusetzenden Inulins und damit der Anbaufrucht, aus der es gewonnen wurde. Für den Fall des Zichorieninulins mit einem mittleren Polymerisationsgrad von DP 10 bis 14 (FREESE, 1993) wird eine Prozesstemperatur von 55–60 °C als ausreichend erachtet (WALTER, 1996). Für die verwendete Inulase II bedeutet dies, dass sie bei dieser Temperatur stabil und aktiv sein sollte.

Weiterhin ist nach ARRHENIUS die Reaktionsgeschwindigkeit chemischer und auch biochemischer Reaktionen eine Funktion der Temperatur. Nach der RGT-Regel bewirkt eine Erhöhung der Reaktionstemperatur um 10 °C eine Verdopplung bis Verdreifachung der Reaktionsgeschwindigkeit – sofern der verwendete Biokatalysator ausreichend stabil ist. Außerdem bewirkt eine höhere Temperatur eine verbesserte Diffusion der Edukte und Produkte, was gerade beim Einsatz heterogener Katalysatoren mit Porenstruktur wichtig ist.

4.4.2 Standzeit und Kontamination bei unsterilem Betrieb

Die Zichorie als Hauptanbaufrucht für Inulin muss nach der Ernte direkt weiterverarbeitet werden (FREESE, 1993). Es ergibt sich daher ein zur Zuckerkampagne vergleichbarer Zeitrahmen,

in dem das Enzym benötigt wird. Hieraus folgt eine Standzeit von ca. zwei Monaten für eine Biokonversionsanlage zur Gewinnung von DFA-III-Dicksaft und des dafür eingesetzten Enzymes.

Die biologische Stabilität des Prozesses steigt mit zunehmender Temperatur, da allgemein von einem geringeren Kontaminationsrisiko im Vergleich zur Situation im mesophilen Bereich ausgegangen werden kann. Im Hinblick auf das Substrat Inulin ist es außerdem wichtig, dass oberhalb von 50 °C nur sehr wenige Pilze lebensfähig sind (MADIGAN *et al.*, 1999), Pilze jedoch entsprechend Abschnitt 4.1.4 die hauptsächlichen Bildner der zur Inulase II konkurrierenden Endo- und Exoinulasen sind.

Bei dem Lebensmittelprodukt DFA III ist es weiterhin wichtig, dass die Berufsgenossenschaft der Chemischen Industrie (BG CHEMIE, 1998) bereits alle Mikroorganismen mit einem Wachstumsoptimum von 40 bis 55 °C der untersten Riskikogruppe 1 zuordnet. Sollte also eine Kontamination bei einem thermophilen Prozess auftreten, so haben die entsprechenden Organismen dennoch kein pathogenes Potenzial.

Die Kontaminationsgefahr kontinuierlich betriebener Biokonversionsanlagen kann zusätzlich durch den Einsatz der in den folgenden Abschnitten beschriebenen Immobilisierungsmethoden reduziert werden.

4.4.3 Grundlagen der Immobilisierung

Aus wirtschaftlichen Gründen sollte ein Enzymmolekül möglichst viele Reaktionen katalysieren, also eine hohe „turn-over-Zahl“ aufweisen. Für kontinuierliche Prozesse bedeutet dies die selektive Rückhaltung oder Rückführung des Enzymes. Eine Übersicht der Methoden findet sich in Abbildung 4.5. Mithilfe von Mikro- oder Ultrafiltrationsmembranen ist es möglich, Enzyme ohne direkte Beeinflussung vom Edukt- und/oder Produktstrom zu trennen. Der hieraus entwickelte Enzymmembranreaktor wurde für zahlreiche Systeme mindestens unter Laborbedingungen eingesetzt (WANDREY *et al.*, 1984; VASIČ-RACKI *et al.*, 1989). Für Prozesse unter unsterilen Bedingungen oder mit unlöslichen Bestandteilen ergeben sich jedoch Probleme durch das einsetzende „Membrane-Fouling“.

Eine mögliche Alternative kann daher die Adsorption des Enzymes an ein Trägermaterial wie z. B. ein Ionenaustauscherharz oder die kovalente Anbindung an einen Träger wie funktionalisiertes hochporöses Glas sein. Nach diesem Schritt sind die Enzyme mit herkömmlicher Siebtechnik in makroskopischem Maßstab handhabbar. Das gleiche Ziel wird auch erreicht, wenn die Enzyme untereinander zu größeren Flocken vernetzt oder in eine für Edukte und Produkte durchlässige Matrix fest eingeschlossen werden. Diese Matrix kann z. B. ein Hydrogel aus natürlichen oder synthetischen Polymeren sein. Der „Cut-Off“ des Geles muss jedoch ausreichend klein sein, um die Enzyme zurückzuhalten.

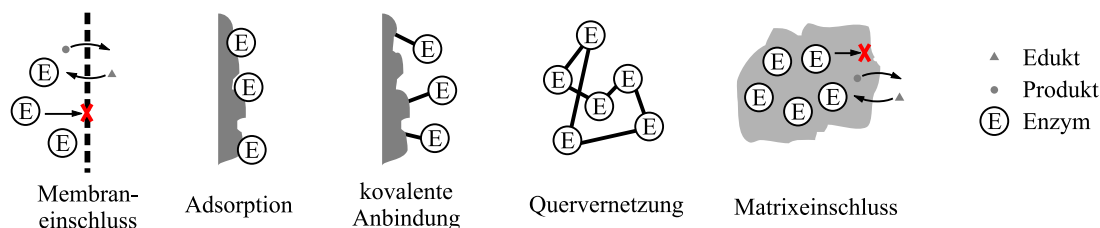


Abbildung 4.5: Immobilisierungsmethoden für Enzyme

Die Immobilisierung hat häufig einen Einfluss auf die Kinetik eines Katalysators. Mögliche Effekte sind z. B. eine Veränderung der Stabilität oder eine durch Modifikationen im reaktiven Zentrum hervorgerufene Inaktivierung oder Verschiebung der Selektivität. Weiterhin kommt es oftmals zu einer Stofftransportlimitierung. Erste systematische Untersuchungen dieser Makrokinetik bei heterogen-katalysierten Reaktionen wurden von DAMKÖHLER (1937) und THIELE (1939) angestellt und sind heute umfassend in den Lehrbüchern der Technischen Chemie dargestellt (BAERNS *et al.*, 1992).

Ist die Geschwindigkeit der Diffusion in z. B. einer Hydrogelperle langsam gegenüber der katalytischen Reaktion, so wird es im Inneren der makroskopischen Katalysatorperle zu einer Verarmung an Reaktanden kommen, die zu einer messbar niedrigeren beobachtbaren Reaktionsgeschwindigkeit führt. Zur quantitativen Beschreibung dieses Phänomens ist der Katalysatorausnutzungsgrad η (teilweise auch Katalysatorwirkungsgrad genannt) definiert. Er ist das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit des immobilisierten Systems (v_{im}) zur Reaktionsgeschwindigkeit ohne das Vorliegen einer Diffusionslimitierung („freier“ Katalysator, v_f):

$$\eta = \frac{\text{beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit } v_{im}}{\text{Reaktionsgeschwindigkeit ohne Diffusionslimitierung } v_f} \quad (4.1)$$

Da hiermit jedoch nur die stationäre Ausnutzung des Katalysators definiert wird, kann bei z. B. einem Batch-Prozess keine Aussage darüber gemacht werden, zu welchem Zeitpunkt ein gewünschter Umsatz erreicht wird. Deshalb wird alternativ der operationelle Katalysatorwirkungsgrad η_{op} (auch operationelle Effektivität genannt) eingeführt, der Reaktionszeiten von freien und immobilisierten Katalysatoren ins Verhältnis setzt (BUCHHOLZ & KASCHE, 1997).

$$\eta_{op} = \frac{\text{Zeit für Umsatz ohne Limitierung } t_{u,f}}{\text{Zeit für gleichen Umsatz im immob. System } t_{u,im}} \quad (4.2)$$

4.4.4 Immobilisierung von Inulase II

Bisherige Arbeiten zur Immobilisierung der Inulase II haben sich hauptsächlich mit der Aufbringung auf heterogene Materialien beschäftigt. In einem von der Mitsubishi Kasei Corp. (Tokyo, Japan) zum Patent angemeldeten Verfahren wird das Enzym durch reine Adsorption auf Anionenaustauscherharzen auf Polystyrolvinylbenzobasis immobilisiert (UCHIYAMA *et al.*, 1989), NEUBAUER (1998) konnte quantitative Enzymaktivitäten an Bentonit binden. Die Immobilisierung aufgrund nur ionischer Kräfte an Diethylaminoethyl-Cellulose (DEAE) hingegen

gelang dort nur unzureichend und auch bei Einsatz poröser CPS-Glas-Perlen ist eine kovalente Anbindung erforderlich, die über eine Vorbehandlung mit Glutardialdehyd erreicht wurde (BARON *et al.*, 1996).

Der Stamm *Arthrobacter ureafaciens* ATCC 21124 produziert neben der extrazellulären auch eine zellgebundene Inulase II. Ebenfalls NEUBAUER (1998) verkapselte daher ganze Zellen bzw. eine mit Glutardialdehyd stabilisierte undefinierte Fermentationsbrühe aus teilweise autolysierten Zellen in eine Alginatmatrix. Die Biokatalysatorperlen zeigten dort auch nach mehreren Waschvorgängen eine konstante Aktivität.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Hydrogeleinschluss von Inulase II aus zellfreien Überständen untersucht werden. Das Enzym ist mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa jedoch zu klein für eine direkte Verkapselung, sodass zunächst eine Vergrößerung des Molekulargewichtes durchgeführt werden muss.

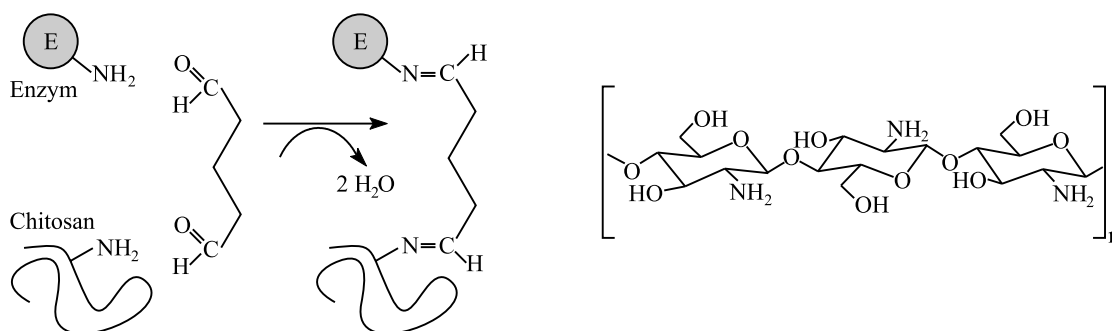


Abbildung 4.6: Vernetzungsreaktion zwischen Enzym, Chitosan und Glutardialdehyd (links) und Ausschnitt aus der Strukturformel von Chitosan (rechts).

Eine Möglichkeit hierzu ist die Vernetzung der Enzyme mithilfe eines divalenten Agens über ihre Aminogruppen untereinander und/oder mit einem löslichen Polymer. In Abbildung 4.6 ist dies für die Verwendung von Glutardialdehyd und Chitosan dargestellt. Die Aldehydgruppen reagieren hierbei mit den Aminogruppen, sodass die beteiligten Moleküle kovalent miteinander verknüpft werden (WALT & AGAYN, 1994). Durch die Vielzahl der möglichen Reaktionen und die Größe der beteiligten Moleküle entstehen makroskopische, flockige Produkte. Die Flocken haben eine ausreichende Größe für den Einschluss in ein Hydrogel.

4.4.5 Hydrogele aus Alginat, Polyvinylalkohol und Curdlan

Hydrogele können aufgrund unterschiedlicher chemischer und physikalischer Mechanismen gebildet werden. Bereits 1966 ist die Immobilisierung in polymerisierten Polyacrylamid-Gelen beschrieben (MOSBACH & MOSBACH, 1966); deutlich schonender ist jedoch die ionotrope Gelbildung, deren verbreitetste Anwendung die Vernetzung von Alginat mit Calciumionen ist (KLEIN & VORLOP, 1985; SMIDSRØD & SKJÅK-BRÆK, 1990). Auf diese Matrix wie zwei

weitere gehen die folgenden Absätze näher ein. Abbildung 4.7 zeigt die Struktur der diskutierten Polymersysteme.

Alginat wird durch Extraktion aus Braunalgen gewonnen und ist ein lineares Copolymer aus Blöcken von β -(1 \rightarrow 4)-D-Mannuronsäure und α -(1 \rightarrow 4)-L-Guluronsäure. Wird eine mit Zellen oder (flockuliertem) Enzym versetzte Natriumalginatlösung in eine Lösung mehrwertiger Kationen getropft, bildet sich sofort eine Membran. In den folgenden Minuten härtet die Alginatperle bis in ihren Kern aus. Da die Gelbildung reversibel verläuft, lösen sich die Gele in Gegenwart von Komplexbildnern oder bei zu hohen Konzentrationen an konkurrierenden einwertigen Ionen wieder auf (HARTMEIER, 1986; VORLOP, 1984). Alginat stellt als Naturstoff ein hervorragendes Substrat für Pilze dar und wird daher unter unsterilen Bedingungen abgebaut. Beide Faktoren schränken seine Anwendbarkeit ein.

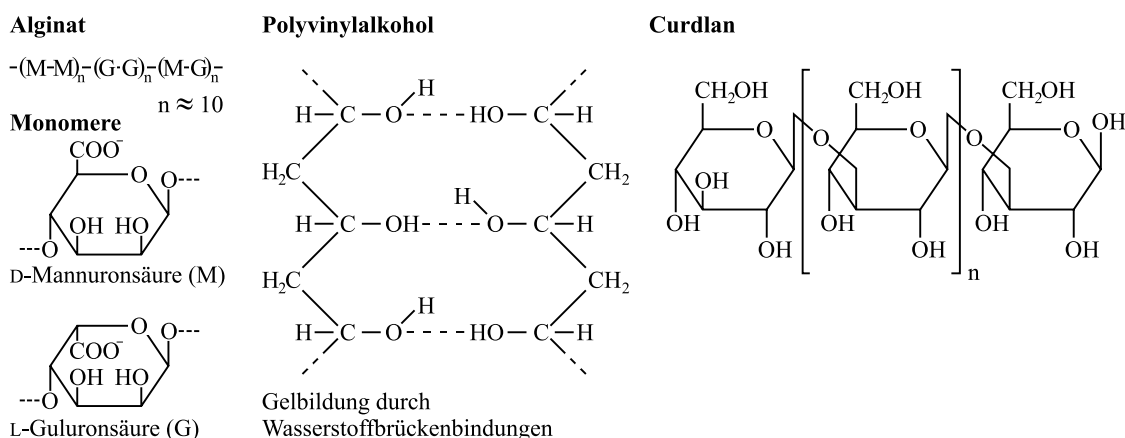


Abbildung 4.7: Hydrogele aus Alginat (links), Polyvinylalkohol (mitte) und Curdlan (rechts); chemische Struktur der zugrundeliegenden Polymerketten und Gelbildung.

Mikrobiologisch stabilere synthetische Polymere haben den Nachteil, dass sie zumeist unter drastischen Bedingungen gelieren und die einzuschließenden Biokatalysatoren schädigen. Eine Ausnahme stellt u. a. das Polymer Polyvinylalkohol (PVA) dar, das durch Hydrolyse von Polyvinylacetat großtechnisch hergestellt wird. Polymerisations- und Verseifungsgrad lassen sich über die Herstellungsbedingungen einstellen. PVA ist heute ein technisches Massenprodukt, das vielfältige Anwendungen z. B. in der Textil-, Papier- und Verpackungsindustrie findet. Durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den PVA-Ketten ist eine Gelbildung möglich, die durch wiederholtes Einfrieren und kontrolliertes Auftauen („freezing-thawing-method“) forciert werden kann (WATASE *et al.*, 1983; LOZINSKY & PLIEVA, 1996; VORLOP & REMMERS, 1991). PVA-Gele haben einen dem Alginat vergleichbaren „Cut-Off“ und sind hochstabil und gleichzeitig sehr elastisch.

Um den für viele Organismen inaktivierenden Einfriervorgang zu vermeiden, lassen sich PVA-Gele auch durch eine kontrollierte Teiltrocknung bei Raumtemperatur erzeugen (JEKEL *et al.*, 1998A). Die entstehenden Partikel haben aufgrund der Herstellungsmethode die Form von einseitig abgeflachten Linsen, wovon sich der Name Lentikat® ableitet. Diese Form hat gegenüber

einer Perle deutlich verbesserte Diffusionseigenschaften, da sie bei einem Durchmesser von 3-4 mm lediglich eine maximale Dicke von 400 μm aufweist. LentiKats® wurden bisher für die Verkapselung zahlreicher pro- und eukaryontischer Mikroorganismen wie Nitrifizierern (JEKEL *et al.*, 1998B) und Clostridien (WITTLICH *et al.*, 1999) eingesetzt, der Einsatz für die Verkapselung von Enzymen wurde noch nicht beschrieben.

Das beschriebene PVA-Gel wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten und löst sich bei einer Temperatur oberhalb von ca. 60 °C wieder auf. Es ist daher für die Immobilisierung thermophiler Biokatalysatoren nur bedingt geeignet.

Hydrogele aus Curdlan können hierzu eine Alternative darstellen. Curdlan³ wurde 1966 von HARADA als Produkt des Bakteriums *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* beschrieben und ist ein ungeladenes, unverzweigtes β -1 \rightarrow 3-Glucan (HARADA, 1977), das heute als Pureglucan® von Takeda Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan) angeboten wird (TAKEDA EUROPE, 1999). Es lässt sich sehr gut in kaltem Wasser dispergieren. Wird diese Dispersion auf 55-65 °C erhitzt und abgekühlt, so bildet sich ein bei Raumtemperatur stabiles Gel. Wird die ursprüngliche Dispersion auf über 80 °C erhitzt, so ist die Gelierung irreversibel. Die Festigkeit des Gels liegt zwischen der von Gelatine und Agar Agar.

Curdlan hat FDA-Zulassung und findet neben den beiden anderen fermentativ hergestellten Polysacchariden Xanthan und Gellan seine Hauptanwendung im Lebensmittelbereich, wo es für die Verfestigung von Gehacktem, für Nudeln und andere Teigwaren, für Fleischersatzprodukte und zur Andickung von Milcherzeugnissen und Saucen verwendet wird (PSZCZOLA, 1997). Die Literaturstellen über die Verwendung von Curdlan als Immobilisierungsmatrix beschränken sich auf ein kurzes Beispiel der Verkapselung von Zellen (VORLOP, 1984) und Untersuchungen über seine Eignung als Medikamentendepot (KANKE *et al.*, 1995).

4.5 Aufgabenstellung

Die Fähigkeit, DFA III aus Inulin zu bilden, war bei Beginn dieser Arbeit für mehrere Bakterienarten beschrieben. Als Referenzstamm für diese Biokonversion stand der Organismus *Arthrobacter ureafaciens* ATCC 21124 zur Verfügung. In einem Screening-Programm sollten Versuche zur Isolierung neuer Stämme und Untersuchungen hieran vorgenommen werden. Im einzelnen sollten folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- Screening nach neuen DFA-III-bildenden Bakterien.
- Untersuchung der exprimierten Enzyme hinsichtlich einer für die technische Anwendung ausreichenden Temperaturstabilität. Die Vorgabe war eine Langzeitstabilität von mehreren Wochen bei einer Temperatur von mindestens 60 °C.

³ „to curdle“ (engl.) = gerinnen

- Charakterisierung positiver Isolate und der gebildeten Enzyme.
- Untersuchungen zur Fermentation eines gentechnisch veränderten Bakteriums, das Inulase II produziert.
- Arbeiten zur Immobilisierung des Enzymes.

Kapitel 5

Manuelles Screening nach neuen DFA-III-Bildnern

5.1 Grundüberlegungen und Medienkomposition

Parallel zu dem oben beschriebenen Aufbau des Screening-Automaten wurde ein manuelles Screening durchgeführt, um DFA-III-bildende Bakterien nach traditioneller Vorgehensweise zu isolieren. Ausgehend von den Überlegungen in Abschnitt 1.3.1 leiteten sich die folgenden Mediumsanforderungen ab:

- Festmedium, damit einzelne Zellen zu erkennbaren Kolonien heranwachsen können.
- Bereitstellung von Inulin als hauptsächlicher Kohlenstoff- und Energiequelle (Selektivitätskriterium).
- Versorgung der Bakterien mit Wachstoffsstoffen und Spurenelementen.
- Stabilisierung des *pH*-Wertes bei evtl. auftretender Säurebildung.

Ausgehend von früheren Arbeiten wurde das Medium JIM2 zusammengestellt, dessen Zusammensetzung in Tab. 5.1 erklärt ist (HARAGUCHI *et al.*, 1988; YOKOTA *et al.*, 1991A). Die Anleitung zur Zubereitung findet sich im Anhang in Abschnitt B.6.2 ab Seite 112. Der relativ geringe Anteil an Hefeextrakt wurde gewählt, weil Vorversuche gezeigt hatten, dass andernfalls auch ohne Zugabe von Inulin unselektives Wachstum auftritt. Ein definiertes Medium vollständig ohne Hefeextrakt war nicht geeignet, da hierbei nur unzureichendes Bakterienwachstum zu beobachten war. Weiterhin zeigten Vorversuche, dass Inulin für Pilze ein sehr gutes Substrat darstellt; die Expression von Inulase I ist hier sehr weit verbreitet (UCHIYAMA, 1993). Da wuchernde Pilze die Isolierung von Bakterienstämmen verhinderten, wurde Cycloheximid als Antibiotikum gegen eukaryontische Zellen zugesetzt.

Tabelle 5.1: Inulinmedium JIM2 zum Screening nach DFA-III-Bildnern**(A) Phosphatversorgung und Pufferung**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2,0 g
KH_2PO_4	1,0 g in 200 mL H_2O

(B) Nährsalze, Spurenelemente und Wachstumsstoffe

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Hefeextrakt	0,25 g
DSM-SL-144 *)	10 mL
DSM-VL-141 *)	10 mL
Agar Agar	17,0 g in 500 mL H_2O

(C) Inulin als Kohlenstoff- und Energiequelle

Inulin	10,0 g
0,1 mol/L NaOH-Lsg.	20 μL in 300 mL H_2O

(D) Antibiotikum gegen Pilzbewuchs

Cycloheximid	60 mg in 5 mL H_2O
--------------	------------------------------------

weitere Angaben zur Medienbereitung und Rezepte für *) siehe Abschnitt **B.6.2** ab Seite **112**

5.2 Inulinauswahl und -behandlung

Um das geforderte Selektivitätskriterium für das Medium zu erfüllen, musste der richtige Inulintyp ausgewählt und seine Behandlung bei der Medienzubereitung optimiert werden. Abhängig vom verwendeten Inulin und den Bedingungen während des Autoklavierens wies das zubereitete Inulinmedium unerwünschte Mengen an Fructose auf, die durch Hydrolyse des Polyfructans entstanden bzw. schon im ausgelieferten Inulin enthalten waren (siehe Abbildung **5.1**).

Der 7,5-L-Tischautoklav Tuttnauer-EL1730 (Systec GmbH, Wettenberg) hat sehr schnelle Aufheiz- und Abkühlzeiten und das Sterilisiergut wird nur unwesentlich länger erhitzt als vorgesehen. Der Großautoklav (VFS/3, Fedegari Autoclavi SPA, Albuzzano, Italien) hingegen ist sehr träge, und das Gut wird bis zu 45 min länger bei der eingestellten Temperatur gehalten, da es kein aktives Kühlsystem gibt. In der Hitze wird das Polymer Inulin verstärkt hydrolysiert und entsprechend hoch waren die Konzentrationen an gebildeter Fructose. Alle Medien wurden daher ausschließlich im Tischautoklav sterilisiert.

Weiterhin war der beobachtete Hydrolysegrad abhängig von der Qualität des verwendeten Inulins. Das Zichorieninulin der Firma Cosucra S. A. (Fontenoy, Belgien) war als technisches Produkt gänzlich ungeeignet, da es auch ohne Sterilisation neben dem gewünschten Inulin die Saccharide Fructose, Glucose und Saccharose in Anteilen von ca. 11 % (w/w) enthält (**NEUBAUER, 1998**). Auch das Dahlieninulin der Fa. Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz) war ungeeignet. Lediglich die Produkte der Firmen Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma-Chemicals (St. Louis,

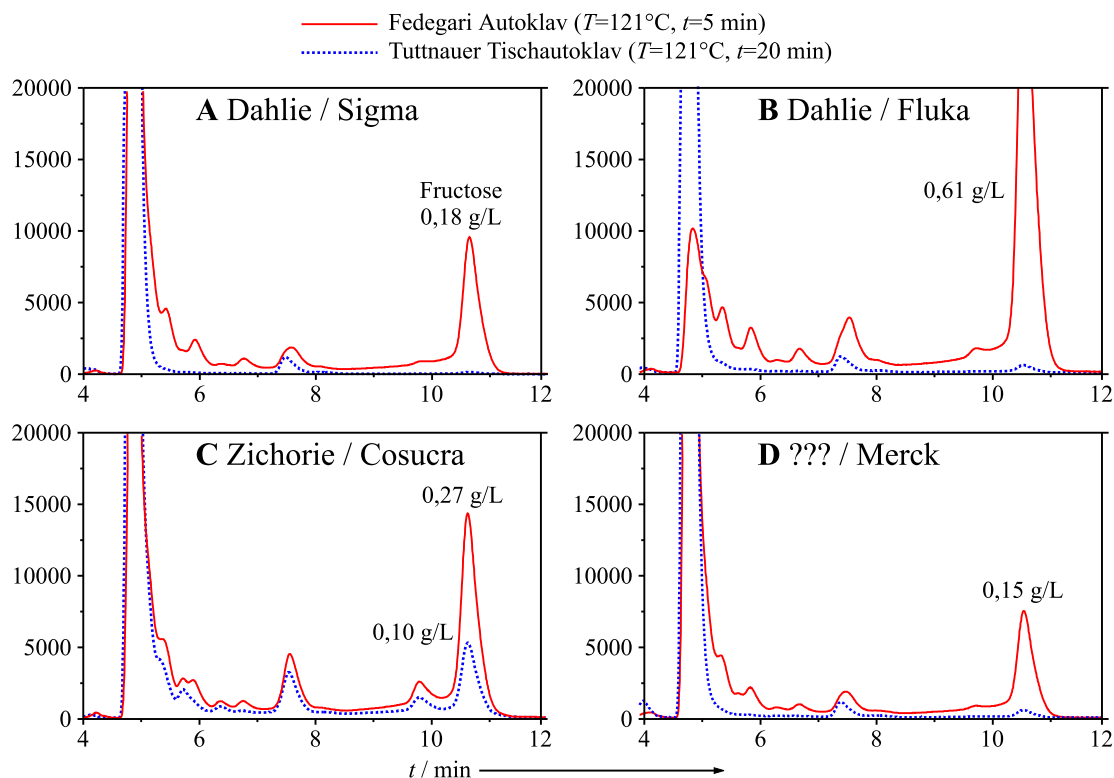


Abbildung 5.1: HPLC-Chromatogramme autoklavierter Lösungen verschiedener Inuline; die angegebenen Autoklavierzeiten sind die jeweils am Gerät eingestellten Werte, die tatsächlichen Zeiten sind im Text erläutert ($c_{\text{Inulin}}=10 \text{ g/L}$ in H_2O).

Missouri) zeigten eine ausreichende Stabilität. Aufgrund des günstigeren Preises wurden alle folgenden Versuche mit dem aus der Dahlie gewonnenen Inulin von Sigma-Chemicals durchgeführt.

Eine entsprechend Abschnitt B.3.2 auf Seite 106 durchgeführte Bestimmung des mittleren Polymerisationsgrades ergab 31,5 bzw. ein mittleres Molekulargewicht von 5.120 Da.

Da Hydrolyse in saurer Umgebung beschleunigt stattfindet, wurde das Inulin stets in separater Lösung autoklaviert. Zusätzlich wurde die Lösung vor dem Autoklavieren mit $20 \mu\text{L/L}$ einer $0,1 \text{ mol/L}$ Natronlauge versetzt.

Durch diese Maßnahmen konnte mit der verwendeten HPLC-Analytik im zubereiteten Inulinmedium keine Fructose mehr nachgewiesen und die geforderte Selektivität erreicht werden.

5.3 Screening nach mesophilen und thermophilen Bakterien

Von potenziellen Standorten wie Komposthaufen mit hohem Grasanteil, angefaulten Zichorienwurzeln und Topinamburknollen und von Wiesen- und Ackerböden wurden Proben entnommen und untersucht. Da nach einem Enzym gesucht wurde, das auch bei erhöhter Temperatur stabil war, wurden die Screening-Versuche auch im thermophilen Bereich durchgeführt.

Hierzu wurden Proben einbezogen, die von heißen Quellen und ähnlichen Orten kamen, an denen geothermische Energie zu Tage tritt. Berichte aus z. B. dem Yellowstone Nationalpark in den USA haben gezeigt, dass an diesen Orten die Wahrscheinlichkeit für das Isolieren thermophiler Bakterienstämme deutlich erhöht ist ([YELLOWSTONE NATIONAL PARK, 1999](#)).

Von den Proben wurden Aufschlämungen angefertigt und diese abhängig von der Inkubationstemperatur entsprechend Abschnitt [B.6.4](#) ab Seite [113](#) entweder durch Ausstrich auf Agarplatten oder in Flüssigkultur untersucht. Weiterhin wurden Agarplatten an zahlreichen Stellen für ca. eine Stunde geöffnet ausgelegt und anschließend inkubiert. Diese Luftkeimplatten zeigten wie zu erwarten nur eine geringe Keimdichte, die isolierten Bakterien wiesen jedoch schon in der Koloniemorphologie eine große Vielfalt auf.

Zur Untersuchung auf Inulase-II-Aktivität wurden die Stämme wie ebenfalls im Anhang beschrieben von den Agarplatten isoliert, in Flüssigkultur genommen und auf DFA-III-Bildung hin untersucht.

Bei der Untersuchung von über 400 Stämmen wurden die folgenden Beobachtungen gemacht, eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse aller untersuchten Proben findet sich im Anhang in Abschnitt [A.3](#) auf Seite [100](#):

- Bei einer Temperatur von 80 °C war auch bei Proben von vielversprechenden Standorten kein Wachstum festzustellen. Aktivitätstests konnten daher in diesem Bereich überhaupt nicht durchgeführt werden.
- Fructose als (enzymatisches) Hydrolyseprodukt des Inulins wurde bei *u0138*, *u0148*, *u0184*, *u0187*, *u0188* und *u0190* beobachtet.
- Der Stamm *u0161* bildete Fructooligosaccharide ohne die Anreicherung von Fructose.
- Die Isolate *u0061*, *u0155*, *u0141* und *uNep89* zeigten im Aktivitätstest DFA-III-Bildung.

Bei diesen Ergebnissen ist zu beachten, dass die für die DFA-III-Analyse verwendete HPLC-Säule (siehe Abschnitt [B.3.1](#) auf Seite [105](#)) lediglich für den Nachweis von Kohlenhydraten und (Zucker-)Alkoholen ausgelegt ist. Geladene Moleküle wie organische Säuren oder Zuckersäuren werden nicht aufgetrennt und verlassen die Säule zusammen mit dem verwendeten Edukt Inulin im Ausschlussvolumen.

Die Anzahl positiver Stämme hinsichtlich der gewünschten DFA-III-Bildung an der Gesamtzahl der untersuchten Isolate liegt bei 1 %. Eine vergleichbare Rate beschreiben UEDA *et al.* mit 0,3 %, die unter 604 untersuchten Stämmen lediglich zwei Bakterienstämme fanden, die DFA I bildeten ([UEDA *et al.*, 1994](#)).

5.4 FOS-Bildung durch *u0161*

Obwohl der Stamm *u0161* keine Inulase II bildete, wurde er aufgrund des Produktspektrums aus dem Screening-Aktivitätstest (siehe Abbildung 5.2) weiter untersucht.

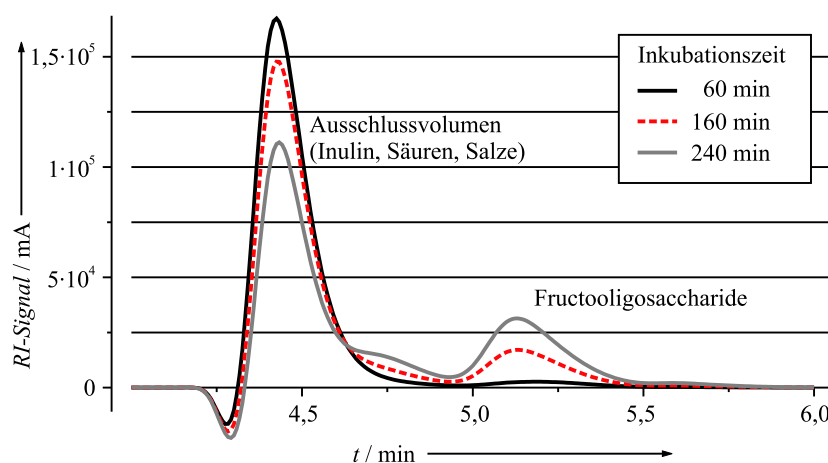


Abbildung 5.2: HPLC-Chromatogramme der Proben aus dem 3-mL-Screening-Aktivitätstest des Stammes *u0161* (HPLC-Analytik: Trennsäule CHO611, RI-Detektor, weitere Bedingungen entsprechend Abschnitt B.3.1 auf Seite 105).

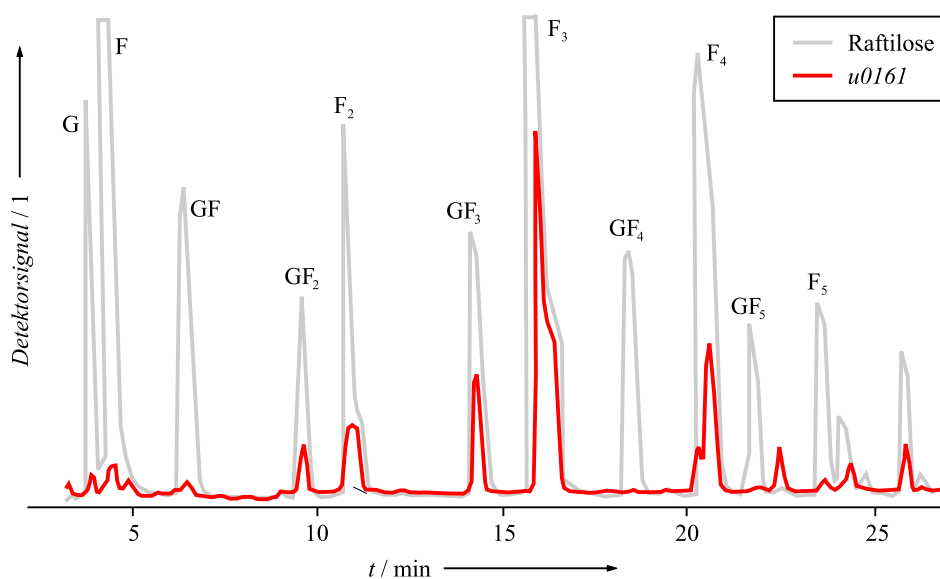


Abbildung 5.3: HPLC-Chromatogramm der Probe aus einer Schüttelkolbenkultur von Stamm *u0161* (Kultivierung: 30 mL JIM2-Medium, 250-mL-Erlenmeyerkolben, 30 °C, pH-Wert-Korrektur; HPLC-Analytik: Dionex entsprechend Abschnitt B.3.3 auf Seite 107, Raftilose® als Standard).

- Der Stamm wächst auf JIM2-Medium in glatten, glänzenden Kolonien, die eine schleimige Struktur haben. Die Bakterienzellen sind bewegliche Stäbchen, ca. 3 μm lang und 0,5 μm breit.

- Als Produkte aus der Umsetzung mit Inulin werden Inulotriose (F₃) und in geringerem Umfang auch F₄ per HPLC nachgewiesen (siehe Abbildung 5.3). Eine Bestätigung dieses Ergebnisses anhand von NMR-Messungen an aufgereinigten Produkten steht noch aus.
- Fructose als Hydrolyseprodukt wird auch bei Umsetzungen mit zellfreiem Kulturüberstand nicht gebildet.
- In Schüttelkolbenkulturen wird das Zellwachstum durch Säurebildung gehemmt. In unregelter Kultur fällt der pH-Wert in 15 h bei JIM2-Medium von 7,0 bis auf unter 5,0 ab. Wird der pH-Wert korrigiert, wächst die Kultur zu deutlich höherer Dichte. Das intensivere Zellwachstum führt zu einer verstärkten Bildung der Produkte F₃ und F₄, die vermutlich durch eine erhöhte Enzymkonzentration im Medium bedingt ist.
- Das verantwortliche Enzym liegt extrazellulär gelöst vor, da Versuche mit gewaschenen Zellen im Gegensatz zu Experimenten mit abzentrifugiertem Kulturüberstand nur minimale Produktbildung zeigten.
- Eine Quantifizierung der gebildeten Fructooligosaccharide erfolgte nicht, da keine entsprechenden Konzentrationsstandards für die Verbindungen F₃ und F₄ vorlagen.

Die von dem Stamm exprimierte Inulase ist damit offensichtlich eine Endoinulase ohne Exoinulaseaktivität, da bei keinem der Versuche Fructose freigesetzt wurde. Ob sie hinsichtlich ihrer Kinetikdaten gegenüber den in der Literatur beschriebenen Enzymen (KIM *et al.*, 1997; YUN *et al.*, 1999) zu bevorzugen ist, müssen weitergehende Untersuchungen klären. Genauso steht auch noch eine Stammidentifizierung und die endgültige Bestätigung der Produkte aus.

5.5 Stammvergleich der DFA-III-Isolate

Um zu überprüfen, ob es sich bei den Inulase-II-produzierenden Stämmen um unterschiedliche Isolate oder um Re-Isolierungen z. B. des Vergleichsstammes *A. ureafaciens* ATCC 21124 handelte, wurde eine vergleichende Analyse der in der Zellmembran vorliegenden Fettsäuren durchgeführt (Stämme u0061, u0155 und u0141). Hierzu wurden die Fettsäuren entsprechend Abschnitt B.3.5 auf Seite 107 extrahiert, zu Methylestern derivatisiert und gaschromatographisch aufgetrennt („fatty acid methyl ester“, FAME).

Die FAME-Analyse ist eine in der mikrobiellen Ökologie angewendete Methode, um einen bakteriellen „Fingerabdruck“ zu erhalten. Weitere Methoden wären hier z. B. molekularbiologische Techniken wie die PCR-Amplifizierung zufällig ausgewählter DNA-Bereiche („random amplified polymorphic DNA“, RAPD), der restriktionsenzymatische Verdau der gesamten DNA und dann entweder die Hybridisierung mit markierter 16S-rDNA eines der Stämme („ribotyping“) bzw. die Auftrennung der Fragmente in der Temperatur-Gel-Gradienten-Elektrophorese

(TGGE) oder aber die Sequenzierung der 16S-rDNA. Diese letzte Methode ermöglicht nicht nur den Vergleich der Stämme untereinander, sondern ordnet unbekannte Stämme in den bakteriellen Gesamtstammbaum ein und lässt zumeist auch eine Artbestimmung zu. Im Gegensatz zur FAME-Analyse erfordern diese Methoden jedoch einen größeren Geräteaufwand oder setzen die Kenntnis bestimmter Informationen über die zu untersuchenden Stämme voraus.

Wie in Abbildung 5.4 zu sehen ist, sind die Unterschiede zwischen Stamm *u0061* und dem Referenzstamm nur gering – beide Stämme sind entweder sehr eng miteinander verwandt oder es handelt sich um eine Re-Isolierung und damit denselben Stamm. Ganz anders hingegen der Stamm *u0155*. Sein Anteil an 12- und 13-Methyltetradecansäure (a15:0 bzw. i15:0) ist größer und er zeigt außerdem mit 2,1 % bzw. 3,2 % einen deutlichen Gehalt an den in den anderen Organismen kaum messbar vorkommenden Fettsäuren Hexadecensäure (16:1) und 10-Methylhexadecanoat (10Me-16:0). Es handelt sich hierbei zweifelsfrei um einen neuen Stamm. Stamm *u0141* distanziert sich nicht so eindeutig von den anderen Isolaten und der Referenz *A. ureafaciens* ATCC 21124. Da er jedoch bei der Fettsäure 14-Methylpentadecansäure (i16:0) deutlich nach unten abweicht (2,5 % im Gegensatz zu 7 bzw. 9,5 %) und beim Methylenhexadecanoat (cycl-17:0) ca. 4 % über dem Referenzstamm liegt, kann auch dieser Stamm als eigenständiges Isolat eingestuft werden. Der Stamm *uNep89* wurde nicht per FAME untersucht, da er erst deutlich später als die anderen Stämme isoliert worden war. Die von ihm gebildete Inulase II wies jedoch nicht die gewünschte Temperaturstabilität auf (siehe Abschnitt 5.6), sodass er auch nachträglich nicht näher untersucht wurde.

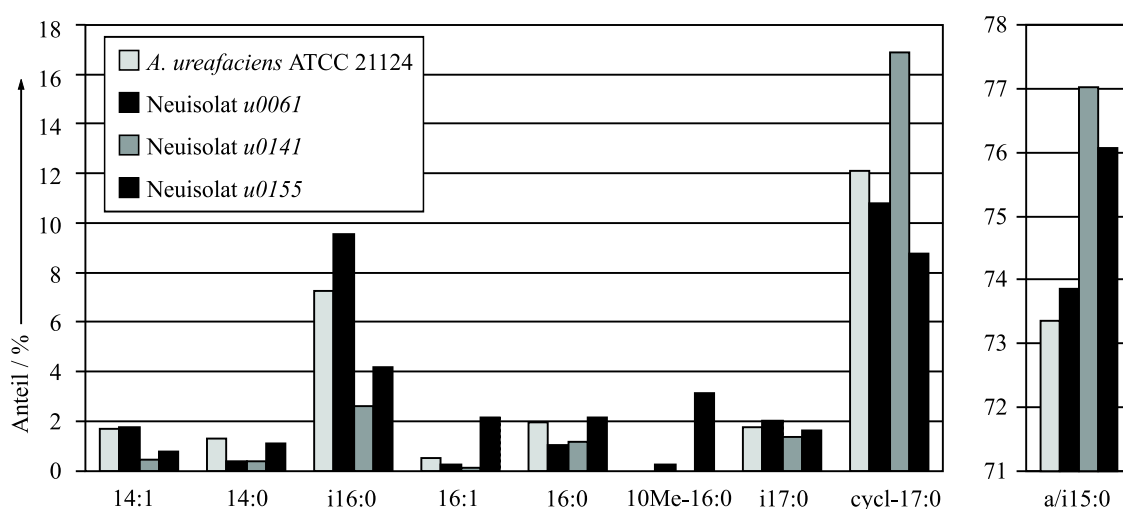


Abbildung 5.4: FAME-Analyse der neu isolierten DFA-III-Bildner; für alle signifikanten Fettsäuren ist der prozentuale Anteil der gemessenen Peakflächen aufgetragen.

Durch die angewendete Screening-Methode war es möglich, neue Stämme von DFA-III-Bildnern zu isolieren. Ob diese ebenfalls mesophilen Stämme (alle wuchsen bei einer Temperatur von $T=30^{\circ}\text{C}$) eine Alternative zu *A. ureafaciens* ACTT 21124 sein konnten, wurde durch die Eigenschaften der gebildeten Inulase II festgelegt. Daher wurde die Temperaturstabilität der exprimierten Enzyme untersucht.

5.6 Temperaturstabilität der Neuisolate

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität wurden Überstände von Übernachtskulturen bei 60 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen Standardaktivitätstests (Abschnitt B.4.1) durchgeführt. Die Isolate *u0061*, *u0155* und *uNep89* verloren wie aus Abbildung 5.5 ersichtlich unter diesen Bedingungen rasch an Aktivität. Bei der Geschwindigkeit der Inaktivierung unterschieden sich die Enzyme etwas (*u0061* z. B. zeigte nach ca. 4 h noch die Hälfte der ursprünglichen Aktivität, während dieser Wert von *u0155* schon nach nur 1 h erreicht wurde), nach 24 h waren alle drei Enzyme inaktiviert worden.

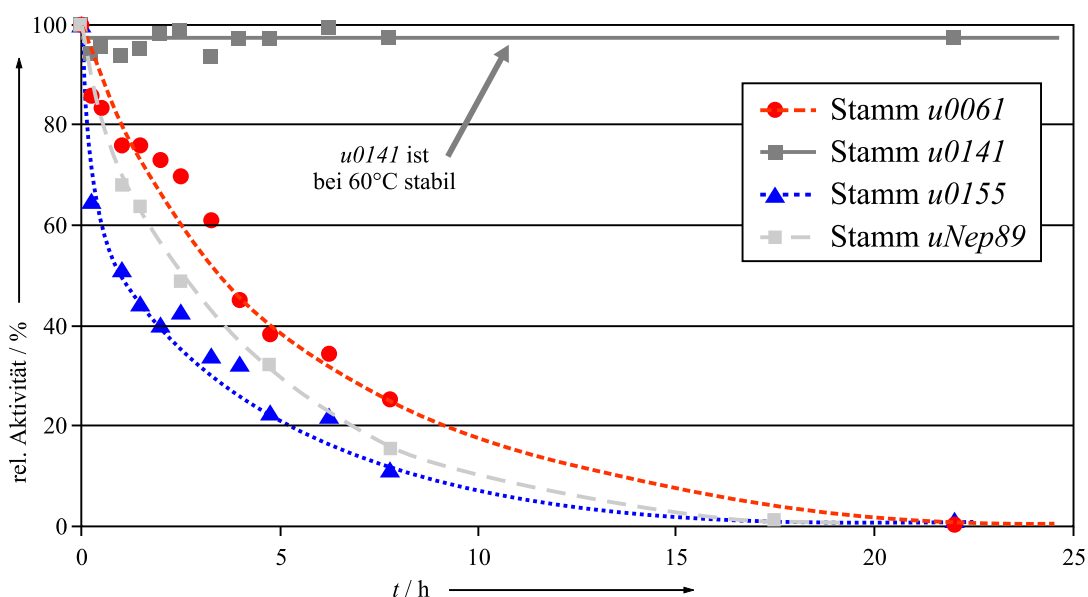


Abbildung 5.5: Temperaturstabilität der Inulase-II-Aktivität der vier Neuisolate; aufgetragen ist die bezogen auf den Anfangswert ($t=0$ h) berechnete relative Aktivität der DFA-III-Bildung (zellfreier Überstand von Übernachtskulturen auf JIM2-Medium; Inkubation bei $T=60$ °C im Wasserbad).

Im Gegensatz hierzu zeigte das Enzym des von einer Luftkeimplatte isolierten Stammes *u0141* über den Versuchszeitraum von 24 h keine Abnahme der Aktivität. Der Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Enzymen fällt schwer, da dort nur kurzzeitige Temperaturuntersuchungen von 20 oder 30 min durchgeführt worden sind (YOKOTA *et al.*, 1991B; UEDA *et al.*, 1994). Eine Gegenüberstellung aller verfügbaren Daten findet sich in Tabelle 6.1 auf Seite 77. Die dort aufgeführten Stabilitäten gehen bis 70 °C, keine der zugänglichen Arbeiten berichtet jedoch von einer Stabilität im Tagebereich für diese hohe Temperatur.

5.7 Umsetzung von Inulin mit *u0141*

Für die nachfolgend geplanten Arbeiten war es wichtig, grundlegende Kenntnisse über die Bedingungen der Inulase-II-Bildung von *u0141* zu haben. Daher wurden neben Schüttelkolben-

versuchen auch erste Kleinfermentationen entsprechend Abschnitt B.6.5 auf Seite 114 durchgeführt.

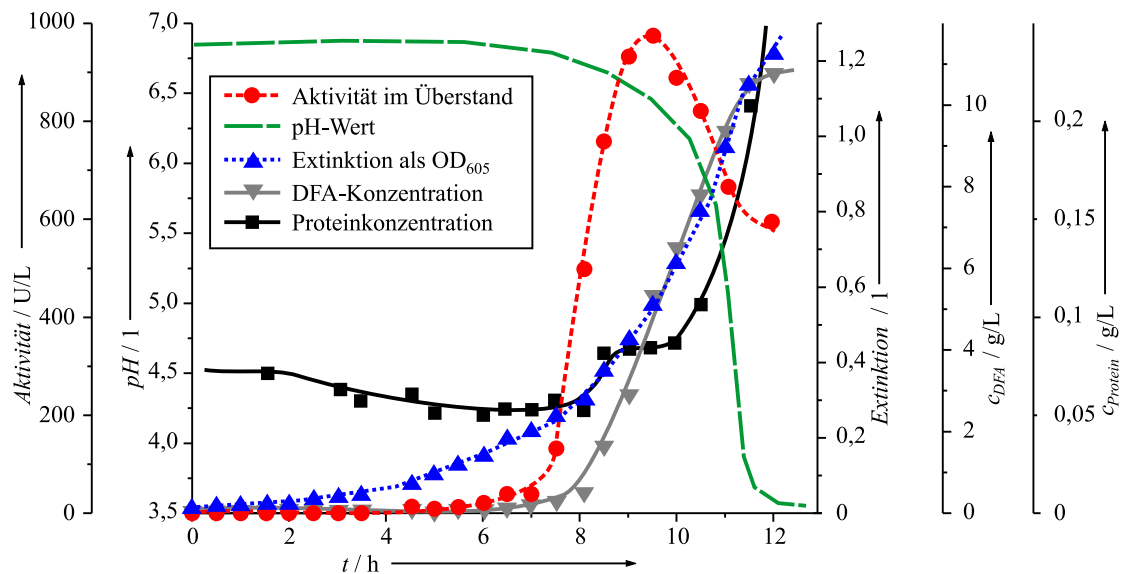


Abbildung 5.6: Kultivierung von *u0141* im 0,5-L-Fermenter (JIM2-Medium, $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p\text{O}_2=80\text{ }\%$, keine pH-Regulierung)

Wie in Abbildung 5.6 zu sehen ist, nahm die Proteinkonzentration im Fermentationsmedium zunächst bei gleichzeitig steigender Trübung des Mediums ab. Die Zellen wuchsen und nahmen die durch den Hefeextrakt bereitgestellten Proteine auf. Die Aktivität von Inulase II setzte erst nach ca. 7 h ein und erreichte zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase ihren Höhepunkt.

Mit dem drastischen Abfall des pH-Wertes und der nach 9 h einsetzenden Zelllyse, die sich durch eine erhöhte Proteinkonzentration im Medium äußerte und auch mikroskopisch beobachtet werden konnte, ging die Aktivität im Überstand zurück. Da das gebildete DFA III nicht im gleichen Maße verstoffwechselt wurde, wie es extrazellulär aus Inulin gebildet wurde, reicherte es sich bis zu einer Konzentration von 11 g/L im Medium an. Im Überstand wurde als Maximalaktivität der Wert von 950 U/L beobachtet.

5.8 Stammbeschreibung für *u0141*

Der aus dem Screening einzige positiv zu bewertende Organismus *u0141* wurde der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) übergeben¹. Für ihn wurde die Hinterlegungsnummer DSM 13464 vergeben, im Rahmen dieser Arbeit wird allerdings ausschließlich die Originalbezeichnung *u0141* verwendet.

¹Hierbei wurde der Name um den Zusatz „inulindegradierendes Bakterium“, abgekürzt mit „IDB“, ergänzt. Bei der DSMZ wurde der Stamm daher irrtümlich mit der ID-Nummer „Buo141“ erfasst.

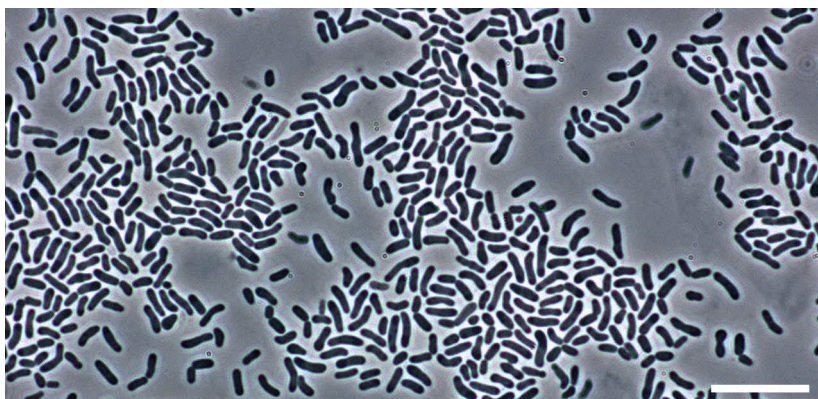


Abbildung 5.7: Mikroskopische Aufnahme von *u0141* (der weiße Balken entspricht 10 μm).

Der Stamm *u0141* wurde mit Methoden der klassischen Mikrobiologie entsprechend Abschnitt **B.6.6** ab Seite **115** untersucht, um eine Identifizierung zu ermöglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle **5.2** auf Seite **69** zusammengestellt. Der von SKERMAN (1967) zusammengestellte Bestimmungsschlüssel führt mit diesen Angaben zur Gattung *Arthrobacter* für *u0141*, eine eindeutige Artzuordnung ist nicht möglich.

Die dieser Einstufung zugrundeliegende Systematik der Bakterien wurde von BERGEY anhand morphologischer und stoffwechselphysiologischer Kriterien erstellt (**HOLT, 1993**). Inzwischen werden Bakterien im allgemeinen aufgrund der Sequenz ihrer 16S-rDNA phylogenetisch eingeordnet und auch identifiziert (**WOESE, 1987**). Eine von der DSMZ mit diesem Ziel durchgeführte Sequenzierung ergab eine Ähnlichkeit von 97,8 % mit der 16S-rDNA von *Arthrobacter globiformis*. Die Abweichung von über 2 % in den Sequenzen ist jedoch zu hoch, um *u0141* dieser Art zuzuordnen. Es handelt sich stattdessen um einen Vertreter einer bislang nicht beschriebenen *Arthrobacter*-Art (**WEISS, 1998**).

5.9 Diskussion der Screening-Ergebnisse

Als Ergebnis der durchgeführten Screening-Arbeiten stand der neue Stamm *u0141* bereit, der eine bei einer Temperatur von 60 °C langzeitstabile Inulase II produziert. In Ergänzung zu den HPLC-Analysen des aus Inulin gebildeten Produktes wurde durch NMR-Untersuchungen bei der Nordzucker AG (Braunschweig) belegt, dass es sich um die gewünschte Verbindung DFA III handelt (**WALTER, 1998**). Das verantwortliche Enzym wird wie bei den meisten in der Literatur beschriebenen Stämmen in das umgebende Medium abgegeben.

Ohne Optimierung werden auf dem sehr selektiven und nährstoffarmen JIM2-Medium bereits Enzymaktivitäten von 1.000 U/L erreicht. Wird der Stamm dagegen auf einem Gemisch aus DFA und Fructooligosacchariden mit pH-Regelung fermentiert, so lassen sich Aktivitäten von 20.000 U/L erzielen (**WALTER, 2000**). Für den Vergleichsstamm *A. ureafaciens* ATCC 21124 wurden hier lediglich 3.500 U/L erreicht (**NEUBAUER, 1998**).

Tabelle 5.2: Physiologische und morphologische Eigenschaften von *u0141***allgemeine Parameter**

strikt aerob, Inkubation bei 30 °C im Dunkeln

Langzeitkonservierung durch Lagerung in 50 % Glycerin bei -80 °C möglich

Lebendstammhaltung durch Kultivierung auf JIM2-Agarplatten

mikroskopische Beschreibung

Gram-positiv, Stäbchen (ca. 1,7 μm \times 0,6 μm), in älteren Kulturen auch unregelmäßige Verbände von zwei bis drei Organismen (pleomorphes Erscheinungsbild), vereinzelt aktive Bewegung, keine Einschlüsse, keine Schleimhülle, keine Sporenbildung

Kolonien auf JIM2-Medium

Umriss rund, konvexe Form, glatter Rand, Oberfläche glänzend, Farbe cremig, keine Fluoreszenz, keine Lumineszenz

Substratverwertung

- | | |
|---------|--|
| positiv | Glucose, Fructose, Trehalose, Mannose, Ribose, Arabinose |
| | Maltose, Galactose, Ethanol, Lactose |
| | Stärkehydrolyse, Lackmusmilch (keine spezifische Reaktion) |
| negativ | Gelatinehydrolyse, Cellulosehydrolyse, Methanol |

Ausbildung spezieller Enzyme

- | | |
|---------|----------------------|
| positiv | Katalase, Inulase II |
| negativ | Oxidase, Inulase I |

Stickstofffixierung

u0141 ist auch in Subkultur in der Lage, auf stickstofffreiem Medium zu wachsen

Beachtenswert ist auch der Stamm *u0161*, der eine bezüglich des Produktes Inulotriose sehr spezifische Endoinulase bildet, die in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden sollte.

Die Isolierung thermophiler Bakterien, die Inulase II bilden, war trotz der Untersuchung zahlreicher Proben auch von vielversprechenden Standorten erfolglos. Schon die Verwertung des Substrates Inulin scheint bei thermophilen Organismen weniger verbreitet zu sein. Trotz der Verwendung sehr frischen Probenmaterials wuchsen deutlich weniger Organismen auf den Anreicherungsböden. Bei einer Temperatur von 80 °C war gar kein Wachstum mehr feststellbar.

Um in Zukunft ein Enzym zu haben, das auch bei Temperaturen oberhalb von 60 °C stabil ist, muss das bisher durchgeführte Screening entweder intensiviert oder molekularbiologische Methoden eingesetzt werden. Eine unter dem Gesichtspunkt des Enzymaufbaus (Aminosäuresequenz, räumliche Anordnung, stabilisierende Strukturelemente) durchzuführende Analyse der in der Literatur beschriebenen und der vier in dieser Arbeit aufgefundenen neuen Enzyme kann Ansatzpunkte für eine gezielte Mutagenese („site-directed mutagenesis“) liefern.

Kapitel 6

Charakterisierung der Inulase II

6.1 Aufkonzentrierung

Die von *u0141* produzierte Inulase II wird als extrazelluläres Enzym in den Kulturüberstand abgegeben. Unter Verwendung des JIM2-Mediums wird wie in Abschnitt 5.7 beschrieben im Kulturkolben bzw. Kleinfärmenter eine maximale Aktivität von ca. 1.000 U/L beobachtet, da die für das Wachstum und die Bildung von Enzymen zur Verfügung stehenden Nährstoffe in diesem selektiven Medium sehr begrenzt sind.

Ziel der im folgenden beschriebenen Versuche war die Aufkonzentrierung des Enzymes, um ausreichend Material für seine Charakterisierung zu erhalten.

6.1.1 Rotationsverdampfung

Da die untersuchte Inulase II bei 60 °C stabil ist, sollte es möglich sein, den Kulturüberstand durch Rotationsverdampfung entsprechend Abschnitt B.8.1 auf Seite 119 aufzukonzentrieren. Um den Verlauf der Aufkonzentrierung zu verfolgen, wurden während des Einrotierens regelmäßig die verbleibende Masse, der Proteingehalt und die Aktivität bestimmt.

Wie in Abbildung 6.1 zu erkennen ist, wurde das Enzym durch die beim Einrotieren zeitweise vorliegenden hohen Konzentrationen an Salzen und anderen Mediumsbestandteilen nicht inaktiviert. Die auf Protein bezogene spezifische Aktivität blieb über die gesamte Aufkonzentrierung bei ca. 2.000 U/g konstant. Die anfängliche volumetrische Aktivität von 1.060 U/L ließ sich auf 29.800 U/L erhöhen. Zur Abtrennung niedermolekularer Bestandteile wurde im Anschluss an diesen Schritt eine Dialyse durchgeführt (siehe Abschnitt B.8.2 auf Seite 119).

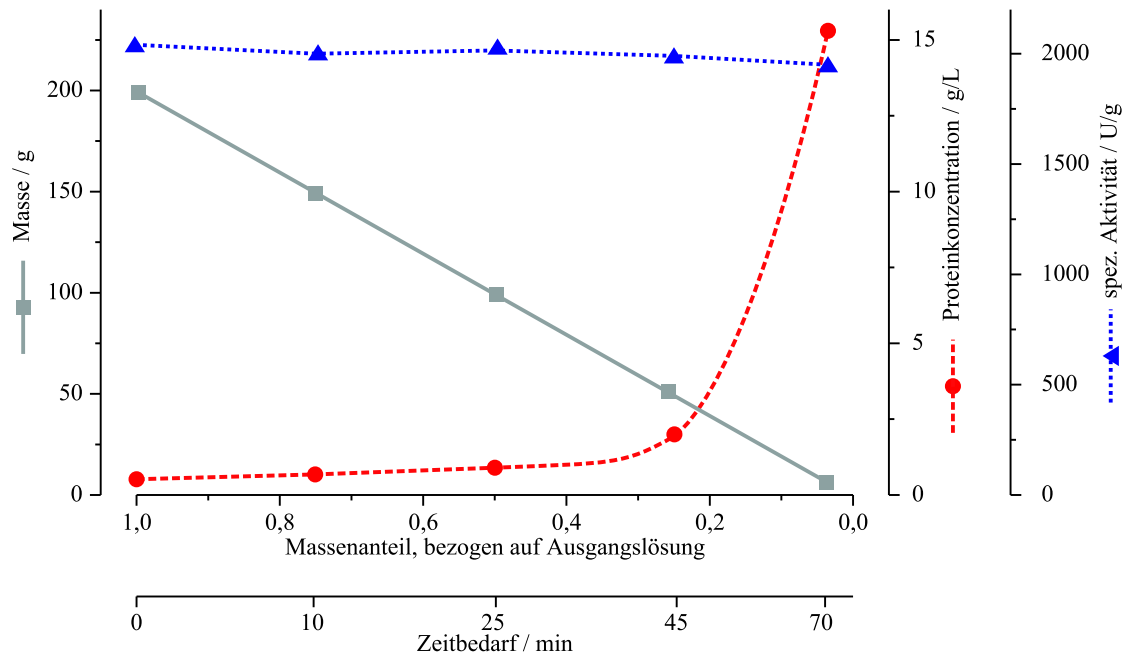


Abbildung 6.1: Verlauf der Aufkonzentrierung beim Einrotieren im Rotationsverdampfer ($T=55^{\circ}\text{C}$, $p=70\text{ mbar}$, $v_{\text{Roti}}=110\text{ Upm}$)

6.1.2 Ammoniumsulfatfällung

Durch Zugabe von Ammoniumsulfat kann die Wasseraktivität in einer Lösung gesenkt werden, sodass die Mikroumgebung von Proteinen dehydratisiert wird. Die hierdurch freiwerdenden hydrophoben Regionen können sich zusammenlagern und es kommt zur Präzipitation und Ausbildung von Proteinfäden, die sich durch Zentrifugation abtrennen lassen (ROSENBERG, 1996). Erfolgt die Zugabe von Ammoniumsulfat sukzessive, wie im Anhang in Abschnitt B.8.3 auf Seite 120 beschrieben, können die Proteine entsprechend ihrer Hydrophobizität fraktioniert werden.

Bis zu einer Sättigungskonzentration von 60 % waren nach Abbildung 6.2 ca. 70 % des Gesamtproteins ausgefallen, jedoch nur ein Drittel der Aktivität war vom Überstand in das Präzipitat übergegangen. Da die Inulase II erst bei einer Sulfatsättigungskonzentration von 80 % quantitativ ausfiel (knapp zwei Drittel der Aktivität präzipitierten hier), kann vermutet werden, dass sie nur wenige hydrophobe Bereiche auf der Oberfläche hat. Da dieses Präzipitat gleichzeitig jedoch lediglich ein Achtel des ursprünglichen Gesamtproteins repräsentierte (die relative Proteinkonzentration sank von 25 % auf 12 %), stellt die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung eine mögliche Methode dar, um die Inulase II für analytische Arbeiten aufzuarbeiten und einen Großteil anderer Proteine abzutrennen.

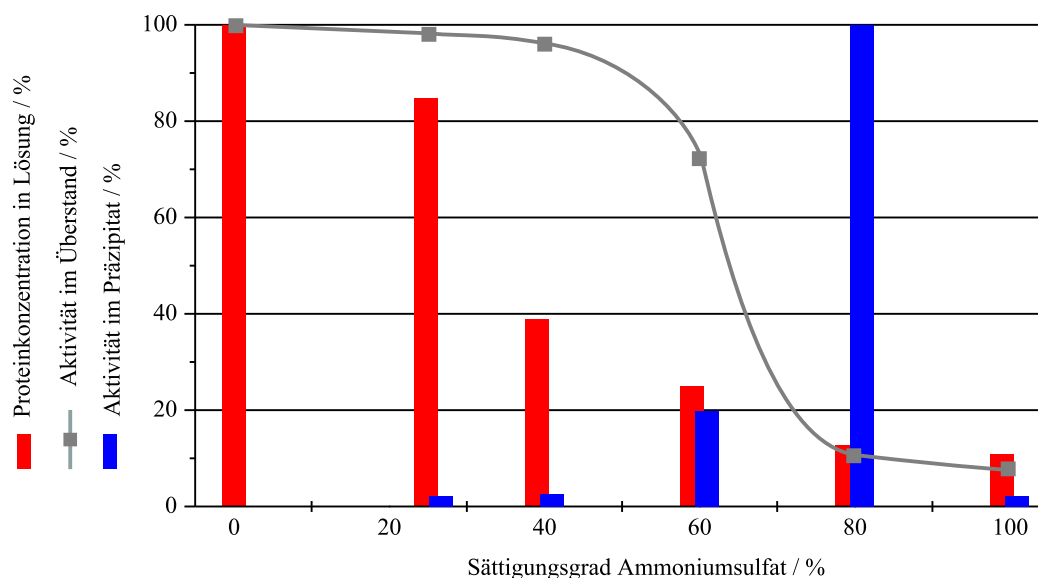


Abbildung 6.2: Verlauf der Ammoniumsulfatfällung; aufgetragen sind die Proteinkonzentration im Überstand und die Aktivität im Überstand und in den Präzipitaten, die zwischen den einzelnen Sättigungsgraden abgetrennt wurden; alle Angaben prozentual bezogen auf den Anfangswert in der Lösung bzw. das Präzipitat mit dem höchsten Wert; nach Abschnitt 6.1.1 eingengter Kulturüberstand von *u0141* in JIM2-Medium.

6.2 Eigenschaften des Enzymes

6.2.1 Größenbestimmung und isoelektrischer Punkt

Die bisher in der Literatur beschriebenen Inulasen bestehen aus Peptidketten zwischen 27 kDa (KAWAMURA *et al.*, 1988) und 62 kDa (KANG *et al.*, 1998), teilweise bestehen die Enzyme auch noch aus Dimeren dieser Moleküle (siehe Tabelle 6.1 auf Seite 77).

Durch elektrophoretische Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen kann die Größe eines Proteins bzw. seiner Untereinheiten im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) bestimmt werden, die Versuchsbedingungen finden sich in Abschnitt B.8.4 auf Seite 120. Wie aus Abbildung 6.3 hervorgeht, hatte das von *u0141* exprimierte und in den Überstand abgegebene Enzym ein Molekulargewicht von ca. 44.700 kDa. Diesen Wert bestätigten inzwischen durchgeführte molekularbiologische Untersuchungen an dem *ift*-Gen¹ von *u0141* (SCHUBERT, 1999), bei denen ein Wert von 43.448 Da aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz errechnet wurde. In der Literatur finden sich vergleichbare Werte für andere von diversen *Arthrobacter*-Stämmen exprimierte Inulasen (abgesehen von *A. ilicis*, dessen Enzym deutlich kleiner ausfällt, vgl. Tabelle 6.1 auf Seite 77).

Durch isoelektrische Fokussierung in einem pH-Gradientengel gemäß Abschnitt B.8.5 auf Seite

¹Die Bezeichnung „*ift*“ für Inulase II ist vom alternativen Namen Inulinfructotransferase abgeleitet und hat sich in der Literatur durchgesetzt.

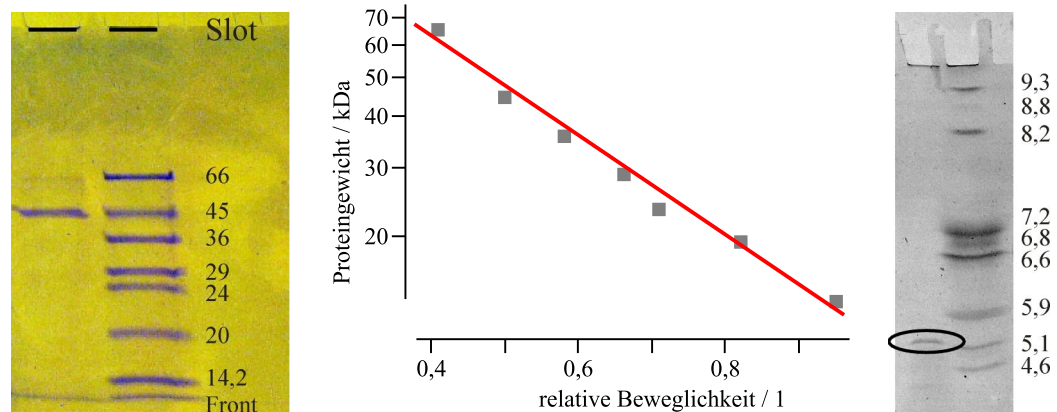


Abbildung 6.3: Elektrophoretische Größenbestimmung im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (links und mitte). Isoelektrische Fokussierung im pH-Gradientengel (rechts); nach Abschnitt 6.1.1 aufkonzentrierte und dialysierte Probe aus dem Kulturüberstand von *u0141*.

120 wurde der isoelektrische Punkt der Inulase bestimmt. Er lag nach dieser Bestimmung bei pH 5,3 (siehe Abbildung 6.3). Bei diesem pH-Wert gleichen sich die Einzelladungen am Enzym gegenseitig aus und das Molekül ist ungeladen. Die Kenntnis dieses Wertes kann z. B. bei der Immobilisierung des Enzyms gezielt genutzt werden, um ionische Interaktionen mit einer Matrix zu ermöglichen.

6.2.2 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Ausgehend von der Auftrennung im SDS-PAGE wurde die Inulase-II-Bande durch Blotting entsprechend Abschnitt B.8.6 auf Seite 121 auf eine Membran transferiert und im EDMAN-Abbau N-terminal ansequenziert. Die Sequenzierung wurde als Auftragsarbeit vom Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart durchgeführt, das einen entsprechenden Dienstleistungsservice anbietet. Die ersten elf Aminosäuren wurden hierbei als D-P-Q-Q-x-T-P-L-N-S-P analysiert (für die fünfte Aminosäure wurde leider kein eindeutiges Ergebnis erhalten).

Wie weiter unten in Abschnitt 7.1 ab Seite 78 beschrieben ist, wurden gentechnische Arbeiten mit *u0141* durchgeführt, in deren Rahmen die Sequenz des *ift*-Genes ermittelt wurde. Nach einer Datenbankanalyse wurde in dieser Sequenz eine „cut“-Stelle für die Abtrennung eines Transferpeptids postuliert (SCHUBERT, 1999). Dieses Transfer- oder Signalpeptid ist in *Arthrobacter* für die Ausschleusung des translatierten Enzymes in den extrazellulären Raum verantwortlich. Es wird für die eigentliche enzymatische Aktivität nicht benötigt und daher während bzw. nach dem Transport durch die Zellmembran abgetrennt.

Die oben aufgeführte Sequenz bestätigte dieses Postulat, da die genannten Aminosäuren Asparaginsäure (D), Prolin (P) und zweimal Glutamin (Q) als erste Aminosäuren hinter der Trennstelle liegen sollten und damit den Anfang des aktiven Enzymes darstellen.

6.2.3 pH-Wert-Einfluss und Temperaturstabilität

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms wurde untersucht, in welchem pH-Bereich Inulin umgesetzt wird. Diese Information ist für einen technischen Prozess wichtig, da sie festlegt, wie sorgfältig (und damit aufwändig) auf eine pH-Konstanz in der umzusetzenden Lösung zu achten ist.

Die Aktivität bei verschiedenen pH-Werten wurde daher entsprechend Abschnitt B.4.2 auf Seite 109 untersucht. Wie aus Abbildung 6.4 hervorgeht, war das Enzym zwischen pH 3 und pH 7 zu mindestens 50 % aktiv, für den Bereich pH 5 bis pH 5,5 wurde das Optimum beobachtet. Es ist hierbei zu bemerken, dass diese Untersuchung sich auf die Einsatzaktivität und nicht auf die Lagerstabilität bezog. Um diese zu untersuchen, hätte das Enzym nach der Inkubation bei verschiedenen pH-Werten wieder aufwändig von der Pufferlösung abgetrennt und im Standardaktivitätstest eingesetzt werden müssen. Diese Untersuchung wurde nicht durchgeführt.

Verglichen mit anderen Inulasen (zumeist Bereich zwischen pH 4 und pH 9) war das Enzym damit etwas toleranter gegenüber niedrigen pH-Werten. Das beobachtete Optimum deckt sich mit dem für die Enzyme aus *A. ilicis* OKU17B (KAWAMURA *et al.*, 1988), *Arthrobacter* sp. H65-7 (YOKOTA *et al.*, 1991B) und dem Referenzorganismus *A. ureafaciens* ATCC 21124.

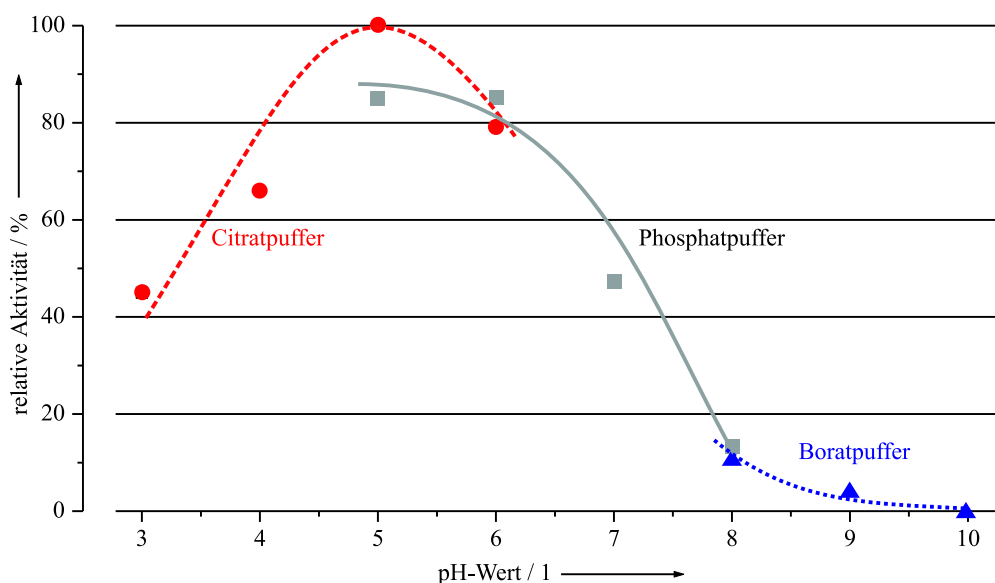


Abbildung 6.4: pH-Wert-Abhängigkeit der Inulase-II-Aktivität (Kulturüberstand von *u0141*, Puffer und Bedingungen wie in Abschnitt B.4.1 auf Seite 109 beschrieben, Aktivitätsangaben prozentual bezogen auf den maximalen Wert).

In Abschnitt 5.6 wurde bereits beschrieben, dass das Enzym von *u0141* bei 60 °C langzeitstabil ist. Durch Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen sollte das genaue Temperaturverhalten bestimmt werden. Die Ergebnisse aus Versuchen mit Enzymlösungen aus unterschiedlichen Kultivierungen (*u0141* bzw. gentechnisch veränderter Organismus *E. coli* MSiftPH, siehe Abschnitt 7.1) sind in Abbildung 6.5 aufgetragen.

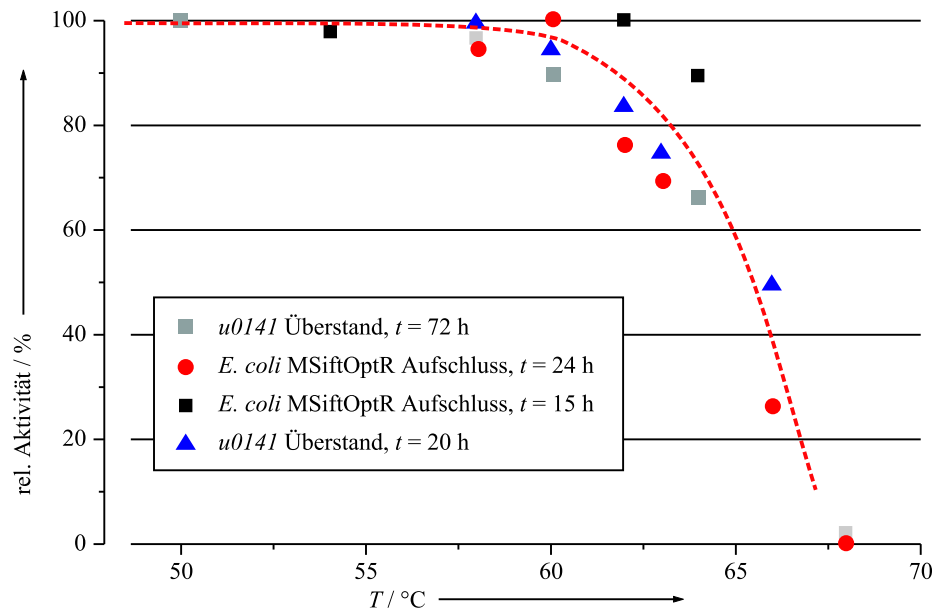


Abbildung 6.5: Temperaturstabilität der Inulase II bei verschiedenen Temperaturen und über verschiedenen Inkubationszeiten; aufgetragen ist die relative Aktivität prozentual bezogen auf den Maximalwert verschiedener Kulturüberstände bzw. Aufschlüsse.

Oberhalb von 60 °C nahm die Stabilität des Enzyms rasch ab und bei 68 °C war nach einem Tag Inkubation keine Aktivität mehr messbar. Die Literatur beschreibt das Enzym von *A. globiformis* C11-1 (HARAGUCHI *et al.*, 1988), das noch bei 75 °C stabil ist, allerdings wurde hier wie auch bei anderen Veröffentlichungen (siehe Tabelle 6.1) lediglich eine sehr kurze Inkubationszeit von maximal 30 min untersucht.

Für den nicht dargestellten Temperaturbereich beginnend bei -20 °C wurden folgende Eigenschaften beobachtet:

- Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen schadete dem Enzym nicht. Dies gilt sowohl für den zellfreien Kulturüberstand bzw. Zellextrakt des gentechnisch veränderten Organismus wie auch für aufkonzentrierte und ausgefällte Enzympräparationen.
- Wurden Überstände von sehr ausgewachsenen Kulturen verwendet, so nahm die Aktivität bei Lagerung bei Raumtemperatur und auch im Kühlschrank ab. Hierbei handelte es sich sehr wahrscheinlich um die Auswirkungen einer Proteaseaktivität.
- Die Lagerfähigkeit konnte deutlich verbessert werden, indem die Enzymlösung vor der Lagerung auf 60 °C erhitzt wurde, um diese Proteasen zu inaktivieren.

6.2.4 Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante

Der Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivität der Inulase II wurde entsprechend Abschnitt B.8.7 auf Seite 121 untersucht. Wie aus Abbildung 6.6 zu sehen ist, war ab einer Konzen-

tration von 80 g/L Inulin keine nennenswerte Aktivitätssteigerung durch zusätzliches Substrat mehr zu beobachten.

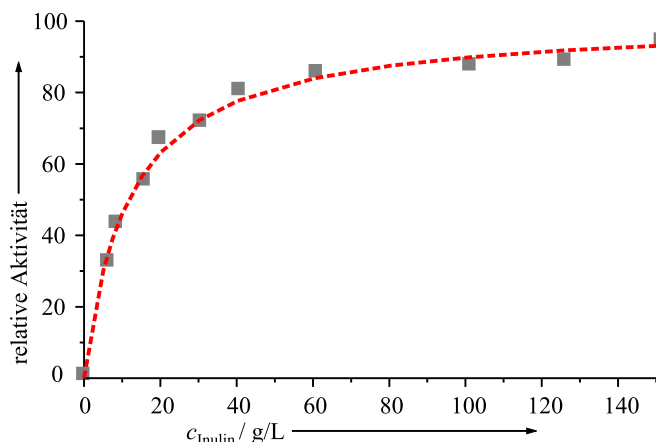


Abbildung 6.6: Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante; Versuchsbedingungen entsprechend Abschnitt B.8.7 auf Seite 121.

Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante K_M errechnete sich zu 11,7 g/L bzw. bei Berücksichtigung des in Abschnitt 5.2 ermittelten Molgewichtes des Inulins von 5.120 Da zu 2,3 mmol/L. Bei Einsatz von Zichorieninulin (Molgewicht 1539 Da) wurde für das gleiche Enzym ein Wert von 5,4 mmol/L beobachtet (WALTER, 2000). Ob der Unterschied ausschließlich auf die Verwendung der unterschiedlichen Substrate zurückzuführen ist, bleibt zu klären. Wie in Tabelle 6.1 auf Seite 77 zusammengestellt ist, sind in der Literatur K_M -Werte im Bereich von 0,8 bis 5,4 mmol/L beschrieben. Das vorliegende Enzym befindet sich hier im Mittelfeld.

6.3 Zusammenfassende Diskussion der Enzymeigenschaften

Die Eigenschaften der in der Literatur beschriebenen Enzyme sind in Tabelle 6.1 gegenübergestellt. Bei den Organismen handelt es sich überwiegend um *Arthrobacter*-Stämme und alle Enzyme weisen einen ähnlichen pH-Toleranzbereich (zumeist ca. pH 4 bis pH 9) auf. Die Angaben für die Temperaturstabilität variieren stärker, über die Langzeitstabilität werden jedoch nur unzureichende Angaben gemacht.

Ausgehend von den beschriebenen Eigenschaften ergeben sich für den technischen Einsatz der vorliegenden Inulase II die folgenden Punkte:

- Die Enzymlösung sollte möglichst rasch nach der Zellabtrennung auf 60 °C erhitzt werden, um Proteasen zu inaktivieren.
- Für die Biokonversion von Inulin sollte eine Temperatur von 55 °C gewählt werden, um bei Systemschwankungen eine Inaktivierung auszuschließen.
- Die Eduktlösung sollte einen pH-Wert im Bereich 5 bis 6 aufweisen.

Tabelle 6.1: Eigenschaften DFA-bildender Enzyme in der Übersicht

Organismus ^{a)}	DFA ^{b)}	kDa ^{c)}	kDa ^{d)}	pH ^{e)}	$T / ^\circ\text{C}$ ^{f)}	$T / ^\circ\text{C}$ ^{g)}	K_m / mM ^{h)}	Literaturstelle
<i>A. globiformis</i> S14-3	I	39	46	3,0 – 9,0 / 6,0	40 (60)	70 (20)		(SEKI <i>et al.</i> , 1989)
<i>Streptomyces</i> sp. MCI-2524	I	36	70	4,5,0 – 9,0 / 6,0	55 (30)	65 (30)		(KUSHIBE <i>et al.</i> , 1993)
<i>Arthrobacter</i> sp. MCI-2493	I	40	40	4,0 – 9,0 / 6,0	50 (30)	70 (30)		(UEDA <i>et al.</i> , 1994)
<i>Arthrobacter</i> No. 11-E	IV							(MURAKAMI <i>et al.</i> , 1993)
<i>A. nicotinovorans</i> GS-9	IV	52	49	4,0 – 12,0 / 6,0	50 (10)	40 (20)		(SAITO <i>et al.</i> , 1997)
<i>A. ureafaciens</i>	III			4,0 – 11,0 / 6–7	50 (30)	50 (30)		(UCHIYAMA <i>et al.</i> , 1973)
<i>A. aurescens</i> IFO12136	III							(UCHIYAMA, 1975)
<i>P. fluorescens</i> No. 949	III							(KURAMOTO, 1988)
<i>A. ilicis</i> MCI2297	III							(UCHIYAMA <i>et al.</i> , 1988)
<i>A. globiformis</i> C11-1	III	45	50	4,0 – 9,0 / 5,0	55 (30)	75 (20)		(HARAGUCHI <i>et al.</i> , 1988)
<i>A. ilicis</i> OKU17B	III	27	50	4,0 – 11,0 / 5,5	60 (30)	70 (30)		(KAWAMURA <i>et al.</i> , 1988)
<i>Arthrobacter</i> sp. H65-7	III	49	100	4,5 – 9,0 / 5,5	60 (10)	70 (10)	0,8 (5.000)	(YOKOTA <i>et al.</i> , 1991)
<i>Enterobacter</i> sp. S45	III							(KANG & KIM, 1993)
Isolat YLW	III			5,0 – 8,0 / 7,5	50 (60)			(BARON <i>et al.</i> , 1996)
<i>A. ureafaciens</i> ATCC 21124	III			4,0 – 8,0 / 5,5			3,0 (1.539)	(NEUBAUER, 1998)
<i>Bacillus</i> sp. snu-7	III	62		4,0 – 7,0 / 6	40 (10)	60 (10)	5,4 (5.000)	(KANG <i>et al.</i> , 1998)
<i>Arthrobacter</i> sp. A-6	III							(KIM & LEE, 2000)
<i>Arthrobacter</i> sp. u0141	III	45		3,0 – 7,0 / 5,0		66 (20)	2,3 (5.120)	diese Arbeit
							5,4 (1.539)	(WALTER, 2000)

a) Name wie in Originalliteratur angegeben

b) wird als Produkt DFA I, DFA III oder DFA IV gebildet (DFA IV dabei nur aus Levanen)

c) unter denaturierenden Bedingungen bestimmte Größe (SDS-PAGE)

d) native Größe (Größenausschlusschromatographie, SEC)

e) pH-Bereich / pH-Optimum

f) T für maximale Aktivität (Inkubationszeit / min)

g) Temperaturstabilität, Maximalwert (Inkubationszeit / min)

h) in Klammern das angenommene Molekulargewicht des Inulins in g/mol

Kapitel 7

Fermentation von *E. coli* MSiftOptR

7.1 Beschreibung und Herkunft des Organismus

Parallel zu den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe gentechnische Arbeiten durchgeführt, deren Ergebnis das in *E. coli* XL-1 blue (Stratagene Corp., La Jolla, Kalifornien) vorliegende Plasmid pMSiftOptR war (SCHUBERT, 1999). Das Plasmid ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) unter der Nummer 13461 hinterlegt. Es beruht auf pUC19 und trägt die aus *u0141* klonierte und optimierte Gensequenz für das Enzym Inulase II.

Nach Klonierung, Sequenzierung und Analyse des gesamten Gens aus *u0141* wurde die für das Transferpeptid codierende Sequenz (siehe Abschnitt 6.2.2) identifiziert und aus dem Plasmid entfernt. Außerdem wurde durch „error-prone-PCR“ eine Punktmutation an Position 661 eingeführt, wodurch im exprimierten Enzym an 221. Stelle Glycin (G) durch Arginin (R) ausgetauscht wurde (SCHUBERT, 2000). Durch diese Mutation weist das Enzym in einer Berechnung der vermutlichen Sekundärstruktur entsprechend dem GOR-Modell (GARNIER *et al.*, 1978) eine deutlich verlängerte Helixstruktur auf. Durch das Fehlen eines geeigneten Signaleptids produziert der *E. coli*-Stamm MSiftOptR im Gegensatz zum Ursprungsstamm *u0141* das gewünschte Enzym intrazellulär.

Unterstützt wurden die gentechnischen Arbeiten durch die Bereitstellung des auf Seite 110 beschriebenen Aktivitätstests für gentechnisch veränderte Organismen (GVO). Eine 5-mL-Kultur des neuen Stammes zeigte hierin eine Aktivität von 435.000 U/L. In der Literatur sind gentechnische Arbeiten mit der Inulase aus *Arthrobacter* sp. H65-7 beschrieben, bei denen nach fast vollständiger Entfernung des Bereichs oberhalb des offenen Leserasters („open reading frame“, ORF) ebenfalls unter Verwendung des Plasmids pUC19 selbst bei einer Großkultur lediglich eine Aktivität von 180.000 U/L beobachtet wurde (SAKURAI *et al.*, 1997B).

7.2 Auswahl des Fermentationsmediums

Um für die nachfolgenden Immobilisierungsversuche auch ohne den Einsatz der in Abschnitt 6.1 beschriebenen Aufkonzentrierungstechniken eine hochaktive Enzymlösung zur Verfügung zu haben, sollte der beschriebene GVO im 10-L-Maßstab fermentiert werden. Verbunden mit dem Ziel der reinen Enzymproduktion waren Vorarbeiten zur Optimierung der Fermentation und die Untersuchung von Alternativen zu dem durch den hohen Anteil an Bactotrypton auch in technischer Qualität noch sehr teuren LB-Medium (vgl. im Anhang Abschnitt B.7.1 auf Seite 116) notwendig. Die Hoch-Zell-Dichte-Fermentation („high cell density cultivation“, HCDC) gerade von *E. coli* ist Thema zahlreicher praktischer und theoretischer Forschungsarbeiten und wird ausführlich in der Literatur diskutiert (LEE, 1996; RIESENBERG *et al.*, 1991; STRATTON *et al.*, 1998).

7.2.1 Einsatz von IPTG als Induktor

Das *ift*-Gen wird auf dem pUC19-Plasmid durch den *lac*-Operator kontrolliert. Für gewöhnlich ist es erforderlich, die Expression eines entsprechend kontrollierten Gens durch die Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) gezielt zu induzieren. Hierzu wurden Schüttelkolbenversuche durchgeführt, die zu folgenden Ergebnissen führten:

- Als unerwünschter Nebeneffekt hemmte IPTG das Wachstum der Zellen und senkte damit die Gesamtausbeute an Inulase.
- Auch ohne Zugabe von IPTG wurde Inulase exprimiert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass pUC19 als „multi-copy“-Plasmid vorliegt und der Wirtsorganismus hierfür eine unzureichende Menge an Inhibitormolekülen zur Verfügung hat. Daher wird die Inulase konstitutiv exprimiert.
- Um eine maximale Enzymproduktion zu erreichen, sollte IPTG erst dann zugesetzt werden, wenn die Kultur aus der Wachstumsphase in die stationäre Phase übertritt. Hierdurch werden in den Zellen die bis dahin inhibierten Genkopien zusätzlich angeschaltet, das Wachstum kann jedoch ungehindert verlaufen.

Da der Einsatz von IPTG eine Fermentation stark verteuert und es zudem als gesundheitsschädlich und krebserregend eingestuft ist (SIGMA ALDRICH, 2000), wurde auf seinen Einsatz jedoch vollständig verzichtet.

7.2.2 Zusatz von Hefeextrakt, Glucose und Glycerin

Ein Großteil der zur Verfügung stehenden preiswerten Substrate führt zu hohen Konzentrationen zur Hemmung des Wachstums. Daher muss eine Fermentation nach dem Fed-Batch-Prinzip

durchgeführt werden, d. h. ausgehend von einem vorgelegten Startmedium werden im Verlauf der Fermentation die Kohlenstoff- und Energie- und bei Bedarf auch die Stickstoffquelle nachdosiert.

Entsprechend Abschnitt B.7.2 auf Seite 116 wurden Schüttelkolbenversuche durchgeführt, um die Parameter für eine Fermentation festzusetzen. Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt:

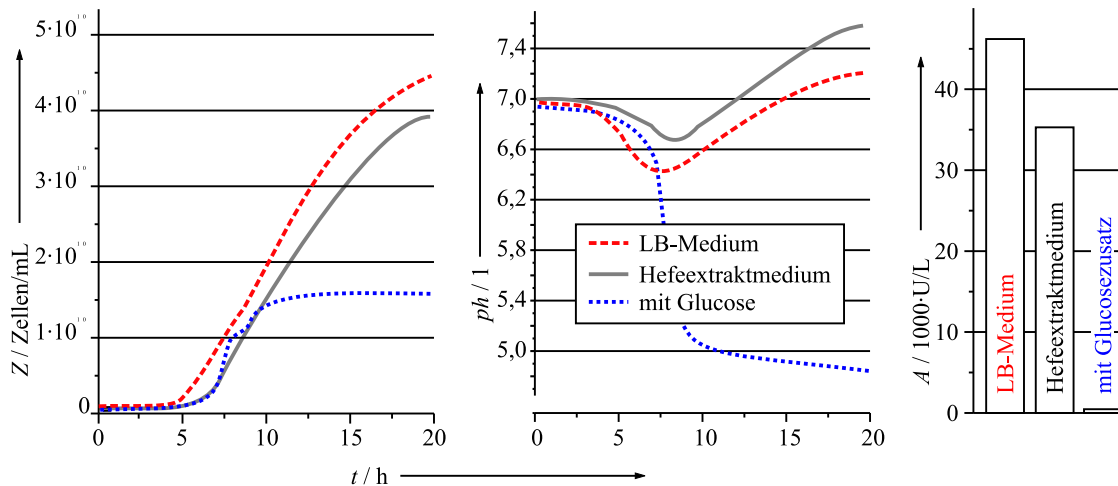


Abbildung 7.1: Vergleich von Zellwachstum, pH -Wert-Entwicklung und Inulase-Aktivität bei Verwendung von LB-Medium, Hefeextraktmedium und bei Zusatz von Glucose (*E. coli* MSiftOptR, Versuchsbedingungen entsprechend Abschnitt B.7.2 auf Seite 116).

- Bei Austausch des Bactotryptons (vgl. Abschnitt B.7.1) gegen die gleiche Menge an Hefeextrakt zeigte die Kultur entsprechend Abbildung 7.1 ein langsames Wachstum und erreichte nur 76 % der Endaktivität. Dies ist jedoch vor dem Hintergrund eines deutlich preiswerteren Mediums – LB-Medium kostet im Vergleich zu Hefeextrakt das zehnfache – zu bewerten.
- Bei Zusatz von Glucose (5 g/L) war (im unregulierten Kulturkolben) ein Abfall des pH -Wertes von 7,0 auf 4,7 zu beobachten. Dies ist auf die Bildung von Acetat zurückzuführen. Acetat ist ein starker Hemmstoff und tritt häufig als unerwünschtes Stoffwechselprodukt bei der Kultivierung von *E. coli* auf. Die erreichte Endzelldichte fiel entsprechend gering aus. Wichtiger ist jedoch, dass durch Glucose die Konzentration an cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem sehr starken Stoffwechselregulator, in den Zellen gering gehalten wird. Da das *lac*-Operon nur bei einem hohen Gehalt an cAMP aktiv ist (SUZUKI *et al.*, 1991), wurden in der auf Glucose gewachsenen Kultur lediglich 0,5 % der Aktivität verglichen mit LB-Medium gemessen.
- Wie Abbildung 7.2 zeigt, war Glycerin als Kohlenstoffquelle geeignet. Bei Konzentrationen größer 5 g/L trat jedoch eine Hemmung auf. Auch diese ist vermutlich auf eine zu starke Bildung von Acetat zurückzuführen.

- Der Zusatz von definierten Stickstoff-, Phosphat- und Schwefelquellen zu dem Hefeextraktmedium zeigte im Schüttelkolbenversuch und im Verlauf einer Testfermentation keine Auswirkungen. Die im Hefeextrakt vorliegenden Mengen an diesen Makronährstoffen sind also ausreichend.
- Für die Fermentation wurde ein Anfangsmedium mit den Nährstoffquellen Hefeextrakt (15 g/L) und Glycerin (2,5 g/L) gewählt. Im Verlauf der Fermentation wurde entsprechend Abschnitt B.7.4 auf Seite 117 im Anhang konzentriertes Hefeextrakt-Glycerin-Medium zudosiert.

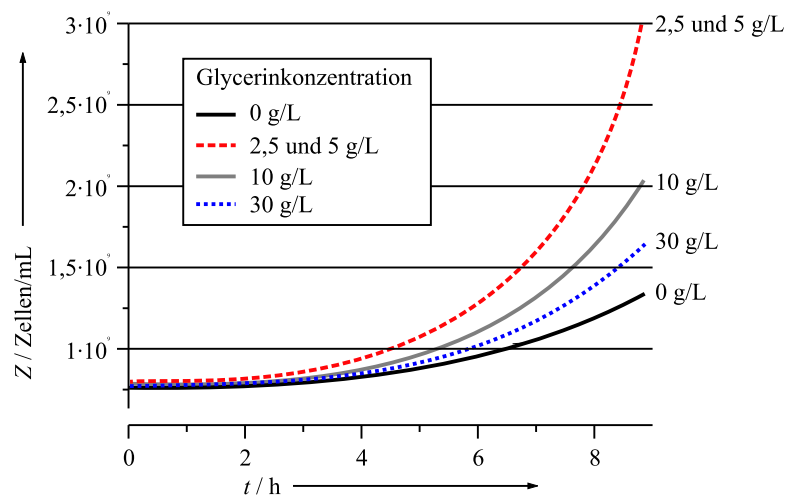


Abbildung 7.2: Vergleich des Wachstums zu Beginn einer Kultivierung bei verschiedenen Konzentrationen an Glycerin in Hefeextraktmedium (*E. coli* MSiftOptR, Versuchsbedingungen entsprechend Abschnitt B.7.2 auf Seite 116).

7.3 Fermentationsverlauf

Die Fermentation wurde wie in Abschnitt B.7.4 ab Seite 117 beschrieben durchgeführt. Wie an dem in Abbildung 7.3 aufgetragenen Fermentationsverlauf ersichtlich ist, häufte sich Acetat im Kulturüberstand an und wurde erst abgebaut, nachdem Glycerin vollständig verstoffwechselt worden war. Da die Analytik für Glycerin und Acetat nicht zeitnah durchgeführt werden konnte, wurde anhand der Sauerstoffzehrung über die Dosage von Zugabemedium entschieden. Dies führte jedoch zu einer immer stärkeren Acetatanhäufung.

Nach 12 h wurde die Fermentation abgebrochen, weil die Zelldichte nur noch sehr langsam zunahm und die inzwischen starke Schaumbildung eine weitere Zugabe des Antischaummittels Struktol erfordert hätte. Bis zu diesem Zeitpunkt waren bereits 0,4 mL/L Struktol zugegeben worden und in Vorversuchen im Schüttelkolbenmaßstab hatte Struktol in größerer Menge zur Bildung weißer Aggregate/Ausfällungen geführt, die eine spätere Weiterbearbeitung stören.

Durch Zellyse lagen mit 311.000 U/L knapp 18 % der Gesamtaktivität von 1,76 Mio U/L im Überstand vor. Damit wurde in dem Fermentationsansatz bei einem Biotrockenmassegehalt von lediglich 10,5 g/L bereits das vierfache der Aktivität im Vergleich zu den 5-mL-Ansätzen erreicht, die zudem mit dem teureren LB-Medium durchgeführt worden waren.

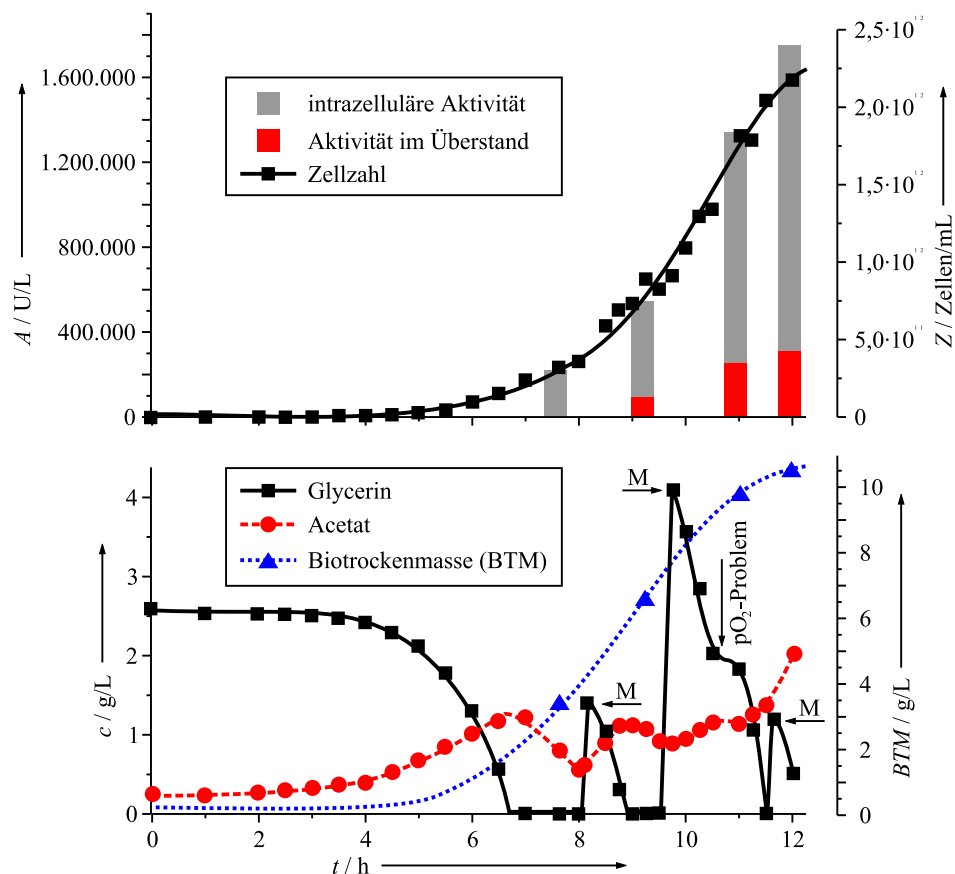


Abbildung 7.3: Verlauf der Fermentation von *E. coli* MSiftOptR; „M“ zeigt die Zudosierung neuen Mediums an.

Im Anschluss an die Fermentation wurde die Zellbrühe direkt im Fermenter auf 60 °C erhitzt und die Rührerdrehzahl auf 1.500 Upm erhöht. Ziele dieser Pasteurisierung waren der weitere Aufschluss und die Abtötung der Zellen. Bereits nach 15 min wurden bei unverdünntem Ausstrich auf LB-Platten keine Kolonien beobachtet, im Überstand waren 28 % der Gesamtaktivität. Dieser Wert konnte auch durch längere Behandlung (bis zu 45 min) nicht gesteigert werden. Es musste daher ein mechanischer Aufschluss der gesamten Fermenterbrühe erfolgen. Dieser wurde wie in Abschnitt B.7.5 auf Seite 119 beschrieben mit einem Hochdruckhomogenisator durchgeführt.

7.4 Diskussion und Ausblick

Die durchgeführten Fermentationen zeigten im Vergleich zu den Schüttelkolbenversuchen sehr viel höhere Zelldichten. Da sie ohne eine automatische Dosierung arbeiteten, fiel die gewonnene Biomasse im Vergleich zu Literaturwerten deutlich geringer aus (RIESENBERG *et al.*, 1991). Es war jedoch auch nicht Anspruch der Arbeiten, eine vollständige HCDC-Strategie auf dem zur Verfügung stehenden System zu etablieren.

In der Literatur wurden mit anderen gentechnisch veränderten *E. coli*-Stämmen nach intensiven Optimierungsarbeiten Biotrockenmassegehalte von 110 g/L (CUTAYAR & POILLON, 1989) erreicht. Geht man von vergleichbaren Werten für den vorliegenden Stamm aus, erscheint es möglich, eine Inulase-Aktivität von über zehn Millionen Units pro Liter zu erreichen.

Kapitel 8

Immobilisierung von Inulase II

8.1 Zielsetzung

Die Literatur berichtet von Immobilisierungen der Inulase II durch die folgenden Methoden: die kovalente Anbindung an poröses Glas (**BARON *et al.*, 1996**), die Adsorption an Bentonit oder den Einschluss ganzer Zellen in Alginat (**NEUBAUER, 1998**). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die zellfreie Immobilisierung von Inulase II in Hydrogelen untersucht werden. Entsprechend den Ausführungen im einleitenden Abschnitt **4.4.4** auf Seite **54** musste die Inulase hierzu zunächst quervernetzt werden.

Die allgemeine Versuchsvorschrift für die Versuche zur Quervernetzung und Immobilisierung der Inulase II findet sich im Anhang in Abschnitt **B.9.1** ab Seite **122**. Die jeweils exakten Parameter sind bei den einzelnen Versuchen angegeben.

8.2 Orientierungsversuche zur Quervernetzung des Enzymes mit dem Kulturüberstand von *u0141*

Da der gentechnisch veränderte Produktionsstamm zu Beginn der Immobilisierungsarbeiten noch nicht zur Verfügung stand, wurden die grundlegenden Orientierungsversuche zunächst mit dem Kulturüberstand von *u0141* durchgeführt. Folgende Fragestellungen sollten geklärt werden:

- Wie stark wird die Inulase II durch die Reaktion mit Glutardialdehyd (GA) geschädigt?
- Bilden sich bei Verwendung von GA und Chitosan stabile Präzipitate?
- Welche weiteren Bedingungen gelten für die Quervernetzung?
- Welches der drei Hydrogelsysteme Alginat, Curdlan bzw. Polyvinylalkohol ist für einen Großansatz zu wählen?

8.2.1 Einfluss des Glutardialdehyds

Um zu untersuchen, ob das Enzym durch die Reaktion mit Glutardialdehyd geschädigt wird, wurden zu einem 20-mL-Ansatz mit 0,25 % (w/w) Fluka-Chitosan und einer absoluten Aktivität von 3,93 U (entsprechend 2,3 mg Protein) unterschiedliche Mengen Glutardialdehydlösung gegeben. Der pH-Wert war bei der Versuchsreihe durch die Chitosanlösung mit 5,5 vorgegeben. Nach einer Inkubationszeit von 12 h wurde der entstandene Niederschlag beschrieben und seine Aktivität untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8.1 dargestellt. Im Anhang findet sich auf Seite 101 für alle Immobilisierungsversuche eine tabellarische Übersicht der eingesetzten Mengen und der Resultate.

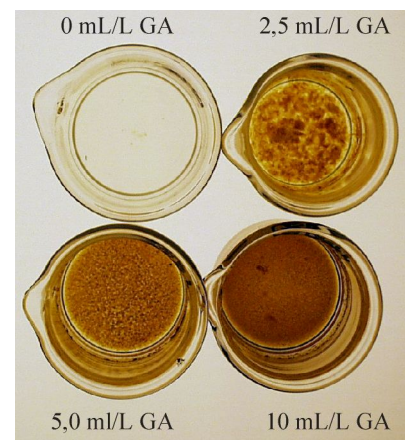
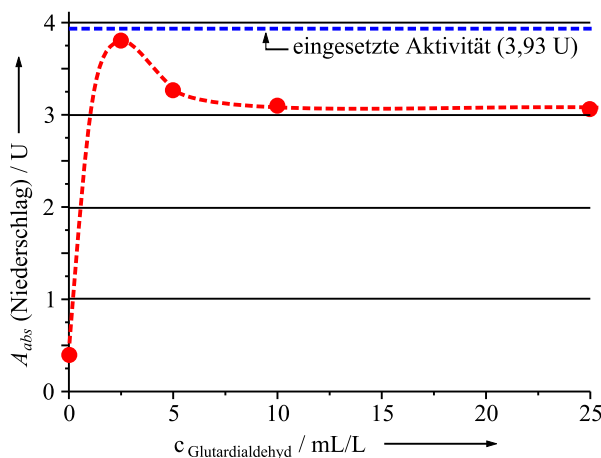


Abbildung 8.1: Einfluss verschiedener Mengen an Glutardialdehyd (20 mL Gesamtvolumen, $A_{\text{abs}}=3,93$ U, 2,3 mg Protein, 0,25 % (w/w) Fluka-Chitosan, pH-Wert 5,5, Zugabe von 0 ... 25 mL/L GA-Lösung ($c=50$ % (w/w)), Inkubation für 12 h bei 20 °C - aufgetragen ist die im Niederschlag gemessene Gesamtaktivität A_{abs}); rechts ein Foto der Bechergläser mit den Reaktionsansätzen in Aufsicht.

Abhängig von der zugesetzten Menge an GA änderte sich die Erscheinung der Präzipitate. Je mehr GA zugesetzt wurde, desto bräunlicher und feiner war der Niederschlag und desto eher setzte er sich ab (siehe Abbildung 8.1, rechts).

Das Enzym Inulase II ließ sich durch die Zugabe von GA mit Chitosan quervernetzen. Bei der eingesetzten Chitosankonzentration wurden durch die Zugabe von 2,5 mL/L GA mit 3,79 U über 96 % der im 20-mL-Ansatz zur Verfügung stehenden 3,93 U Gesamtaktivität gebunden. Bei höheren Zugaben von GA sank dieser Wert leicht auf ca. 80 % ab. Eine Schädigung des Enzymes konnte jedoch selbst bei einer Zugabe von 25 mL/L GA-Lösung nicht beobachtet werden. Die Molekulargewichtsvergrößerung durch Quervernetzung unter Reaktion mit GA war für die vorliegende Inulase II somit möglich. Im folgenden wurden daher die weiteren Parameter untersucht.

8.2.2 Reaktionszeit und Stabilität des gebildeten Netzwerkes

Zur Kontrolle, ob die Inulase tatsächlich kovalent in das Netzwerk eingebunden wurde, wurde der entstandene Niederschlag nach der Vernetzungsreaktion mehrfach gewaschen. Weiterhin sollte überprüft werden, wie sich unterschiedliche Konzentrationen an Chitosan und eine längere Reaktionszeit auf das Ergebnis auswirken. Hierzu wurden 20-mL-Ansätze mit einer Gesamtaktivität von 7,14 U (entsprechend 3,2 mg Protein) bei Chitosankonzentrationen im Bereich von 0 bis 3,5 % (w/w) Fluka-Chitosan und Zugabe von 2,5 mL/L GA-Lösung nach 16 und nach 40 h Reaktionszeit untersucht.

Die in Abbildung 8.2 aufgetragenen Werte für Überstand, Präzipitat und dreifach gewaschenes Präzipitat bestätigten den Befund des vorherigen Versuches. Das Enzym wird durch GA nicht geschädigt, da die Summe aus Restaktivität und Aktivität des Präzipitates die ursprünglich eingesetzte Aktivität ergibt. Lediglich nach einer deutlich längeren Inkubationszeit von 40 h ist hier eine Abnahme bei den unteren Chitosankonzentrationen zu beobachten, die aber vermutlich eher auf Proteaseaktivität zurückzuführen ist (Reaktion bei Raumtemperatur).

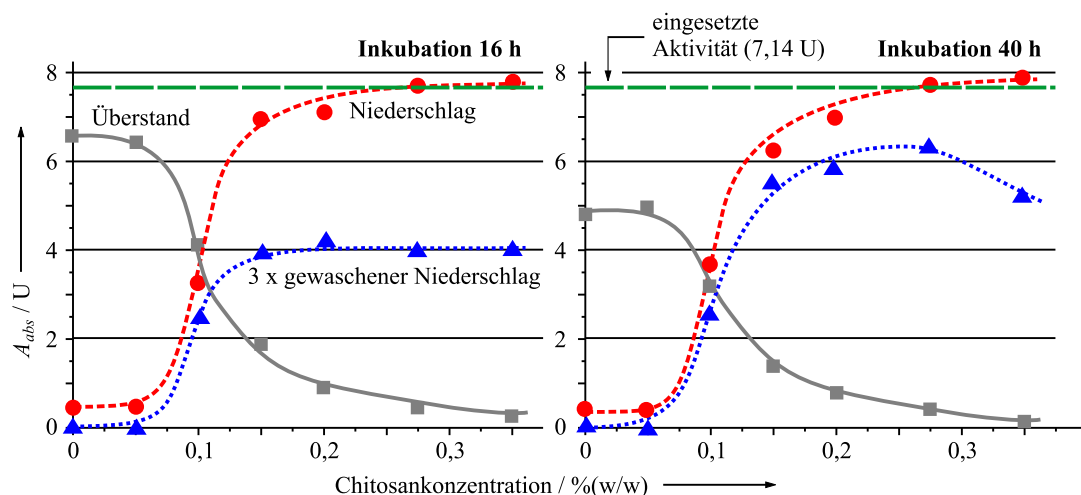


Abbildung 8.2: Einfluss verschiedener Chitosankonzentrationen und der Reaktionszeit auf die Güte der Enzymanbindung (20 mL Gesamtvolumen, $A_{abs}=7,14$ U, 3,2 mg Protein, 0 ... 0,35 % (w/w) Fluka-Chitosan, pH-Wert 5,5, Zugabe von 2,5 mL/L GA-Lösung ($c=50$ % (w/w)), Inkubation für 16 bzw. 40 h bei 20 °C).

Alleine durch die Zugabe von Glutardialdehyd ließ sich kein abtrennbarer Niederschlag erhalten. Erst ab einer Chitosankonzentration von 0,1 % (w/w) wurden signifikante Mengen des Enzymes ausgefällt. Bereits ab 0,1 % (w/w) wurde zunächst die gesamte vorliegende Aktivität im Niederschlag gebunden.

Durch Waschen des Präzipitates ging nach einer Reaktionszeit von 16 h jedoch die Hälfte dieser zunächst gebundenen Aktivität verloren. Die Enzyme wurden hier also nur mechanisch eingeschlossen, nicht aber irreversibel gebunden. Durch eine längere Reaktionszeit wurde die Bindungsrate erhöht und nach 40 h konnten nur noch 16 % der Enzyme ausgewaschen werden.

Das Absinken der Kurve für den gewaschenen Niederschlag nach der längeren Reaktionszeit bei höheren Chitosankonzentrationen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die zunehmende Anzahl an Aminogruppen des Chitosans zu stark mit den Lysinresten der Enzyme konkurrierte. Es kam vermehrt zu inter- bzw. intramolekularen Reaktionen der Chitosanmoleküle untereinander.

Durch einen Matrixversuch mit gleichzeitiger Variation der Chitosankonzentration und der GA-Zugabemenge sollte sich dieses Verhalten minimieren lassen. Ein entsprechender Ansatz findet sich weiter unten bei der Quervernetzung der Enzymlösung, die aus der GVO-Fermentation gewonnen wurde. Im Rahmen der im aktuellen Abschnitt beschriebenen Vorversuche wurde er nicht durchgeführt.

8.2.3 Weitere Parameter zur Quervernetzung und Zusammenfassung

Neben der Reaktionszeit wurde der Einfluss der Reaktionstemperatur untersucht. Hierzu wurden parallele Versuche im Kühlschrank (4 °C) und bei 20 °C angesetzt. Die anschließend im Überstand und im Präzipitat messbaren Aktivitäten wurden durch die Temperatur nicht beeinflusst. Die Reaktion bei 4 °C ist jedoch vorzuziehen, weil bei dieser Temperatur evtl. im Ansatz vorhandene Proteasen weniger aktiv sind und sich ein deutlich feineres Präzipitat bildete. Die Qualität des Präzipitates ist selbstverständlich auch von der Intensität des Rührens während der Vernetzungsreaktion abhängig, die daher möglichst hoch sein sollte.

Mit den folgenden Mengen- und Konzentrationsverhältnissen und der Versuchsvorschrift aus Abschnitt B.9.1 auf Seite 122 wurden bei der Quervernetzung des Überstandes von *u0141* die besten Ergebnisse in den Orientierungsversuchen erzielt:

Rohenzymlösung: Zellfreier Überstand von *u0141* ($A_v=500-1.000$ U/L), der zu gleichen Teilen mit Chitosanlösung versetzt wird, sodass im Reaktionsansatz 250-500 U/L sind.

Chitosankonzentration: 0,5 % (w/w) Fluka-Chitosan-Lösung, die zu gleichen Teilen mit Enzymlösung vermischt wird, sodass sich im Reaktionsansatz 0,25 % (w/w) befinden.

Glutardialdehydkonzentration: 2,5 mL/L einer 50 % (w/w) Glutardialdehydlösung.

sonstige Bedingungen: Reaktion für mindestens 40 h unter starkem Rühren bei 4 °C.

8.3 Auswahl der Matrix für den Hydrogeleinschluss

Die in der Einleitung vorgestellten Polymere Curdlan, Polyvinylalkohol und Alginat standen für den Einschluss eines größeren Ansatzes zur Diskussion und ihre grundsätzliche Eignung sollte untersucht werden.

8.3.1 Einschluss in Curdlan-Gele

Da Vorversuche gezeigt hatten, dass das unvernetzte Enzym nicht ausreichend in dem von Curdlan gebildeten Hydrogel zurückgehalten wird, musste die Inulase II vor dem Einschluss entsprechend der zuvor beschriebenen Ergebnisse ausgefällt werden.

Die verwendete Enzymlösung hatte eine Aktivität von 1.060 U/L. Nach der Präzipitation wurden 40 mL des Reaktionsansatzes abzentrifugiert und in 20 mL Puffer aufgenommen, um die durch die Vermischung mit der Chitosanlösung zunächst hervorgerufene Verdünnung zu kompensieren.

Auf die durchaus mögliche Aufkonzentrierung der Enzymaktivität durch die Resuspendierung des abgetrennten Niederschlages in einer deutlich geringeren Menge an Puffer wurde an dieser Stelle bewusst verzichtet.

Nach Zugabe von 7 % (w/w) Curdlan unter Rühren wurde die gequollene Suspension entsprechend Abschnitt B.9.2 auf Seite 123 zur Aushärtung in heißes Öl getropft. Durch den Druck in der Spritze kam es hierbei zu einer teilweisen Phasentrennung: Zum einen bildeten sich fast völlig klare Tropfen, zum anderen war die aus der Spritze austretende Suspension so stark mit Curdlan angereichert, dass die Bildung einzelner Tropfen nicht möglich war und sich ein strangförmiges Produkt ergab.

Diese Inhomogenität spiegelte sich in den Aktivitäten der untersuchten Partikel wieder, die zwischen 375 U/kg bzw. 375 U/L (35 % der ursprünglich eingesetzten Aktivität) und 875 U/L (83 %) lagen. Neben der Phasentrennung bei der Verarbeitung der Suspension war die Entfernung des anhaftenden Ölfilmes nach Aushärtung der Partikel problematisch.

Die Versuche haben gezeigt, dass Curdlanhydrogele grundsätzlich für den Einschluss von Inulase II geeignet sind und das Substrat Inulin ausreichend in die Matrix eindringen kann. Bei der Verkapselungstechnik selber besteht jedoch noch Optimierungsbedarf.

8.3.2 Einschluss in Polyvinylalkohol – LentiKats®

Weiterhin wurde die Eignung einer Matrix auf Basis von Polyvinylalkohol entsprechend Abschnitt B.9.3 auf Seite 123 untersucht. Die Aktivität der verwendeten Enzymlösung betrug 590 U/L. Von dem Vernetzungsansatz wurden 100 mL abzentrifugiert, das Präzipitatpellet in 20 mL Puffer aufgenommen und mit 80 mL LentiKat® Liquid versetzt. Für die Ausgangsaktivität ergibt sich somit unter Berücksichtigung der Verdünnung durch die Chitosanzugabe ein Wert von 295 U/L.

Nach vorschriftsgemäßer Gelierung der LentiKats® wurde eine Aktivität der Linsen von 200 U/L festgestellt. Dies entspricht einem Anteil von 68 % der eingesetzten Aktivität. Der Vergleich mit einem theoretisch zu erwartenden Wert fällt aufgrund der Linsenform der Immobilisatpartikel schwer.

8.3.3 Einschluss in Calciumalginat

Im Gegensatz zu Hydrogelen aus Curdlan und Polyvinylalkohol ist die Verwendung von Calciumalginat für den Einschluss von quervernetzten Enzymen eine in der Literatur häufig beschriebene Methode. Es lassen sich auch in kleinstem Maßstab exakte Perlen herstellen und die leichte Auflösbarkeit der Matrix, die in der technischen Anwendung ein Problem darstellen kann, ist für die Untersuchung von Diffusionseinflüssen von Vorteil.

Motiviert durch die Probleme bei der Verarbeitung des Curdlans und unter Berücksichtigung der schwierigen geometrischen Form des Linsens wurde daher Calciumalginat für den späteren Großansatz ausgewählt. Die Ergebnisse der Vorversuche mit dieser Matrix sind hier nicht aufgeführt, da weiter unten eine ausführliche Diskussion erfolgt.

8.4 Immobilisierung des Enzymes aus *E. coli* MSiftOptR

8.4.1 Parameteroptimierung zur Quervernetzung

Leider waren die in den Orientierungsversuchen für Enzymlösungen aus *u0141* bestimmten Konzentrationsverhältnisse nicht auf die Arbeit mit dem Zellextrakt aus der in Abschnitt 7.3 ab Seite 81 beschriebenen Fermentation von *E. coli* MSiftOptR übertragbar. Die Bindungskapazität des bisher verwendeten Fluka-Chitosans war unzureichend, höher konzentrierte Chitosanlösungen waren aufgrund der Viskosität allerdings nicht mehr praktikabel. Daher wurde im folgenden alternativ ein sehr niedermolekulares Chitosan der Fa. Primex Ingredients ASA (Avaldsnes, Norwegen) verwendet.

Weiterhin wurde zur Beurteilung der Quervernetzung wie in Abschnitt B.9.1 auf Seite 122 beschrieben nicht mehr der abzentrifugierte und gewaschene Niederschlag untersucht, sondern als Abtrennverfahren ein zwischenzeitlicher Einschluss in Alginat vorgenommen. Die Alginatmatrix wurde somit also als Filter zur Abtrennung nicht ausreichend gebundener Enzyme eingesetzt. Hierzu wurde die gesamte quervernetzte Lösung mit Alginat versetzt und durch Eintropfen in Calciumchloridlösung Hydrogelerlen gebildet. Diese wurden intensiv gewaschen und anschließend gezielt wieder aufgelöst, um die Aktivitätsmessung ohne Diffusionslimitierung durchführen zu können.

In einem Matrixversuche wurde die optimale Kombination aus Chitosankonzentration und GA-Zugabemenge bestimmt. Wie aus Abbildung 8.3 hervorgeht, wurde die maximale Aktivität flockulierten Enzymes bei einer Chitosankonzentration von 0,45 % (w/w) und einer GA-Zugabe von 25 mL/L erreicht. Die dann wiedergefundene Aktivität betrug ca. 600 U/g, eine tabellarische Zusammenstellung aller Werte findet sich wieder im Anhang auf Seite 101. Berücksichtigt man die durch die Vermischung mit der Chitosanlösung stattgefundene Verdünnung der Aus-

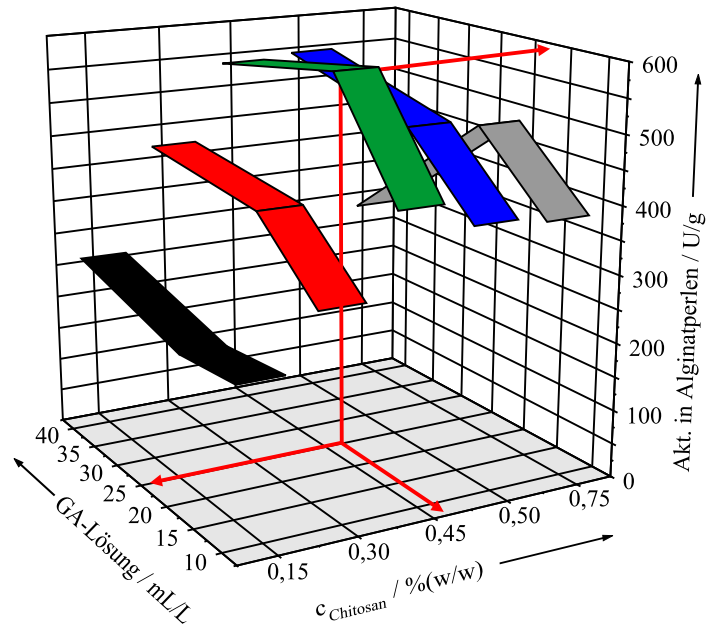


Abbildung 8.3: Einfluss verschiedener Chitosan- und Glutardialdehydkonzentrationen auf die in der Alginatmatrix rückhaltbare Aktivität (10-mL-Ansatz ($A_v=1,76 \cdot 10^6$ U/L bzw. 1.760 U/mL, $c_{\text{Protein}}=5,6$ g/L), 0,15 ... 0,75 % (w/w) Primex-Chitosan, pH-Wert 5,5, Zugabe von 10/20/40 mL/L Glutardialdehydlösung ($c=50$ % (w/w)), Inkubation für 16 h bei 4 °C, Alginateinschluss mit anschl. Perlenauflösung).

gangsenzymlösung ($A_v=1.760$ U/mL) auf 880 U/mL, so sind dies 68 % der eingesetzten Aktivität, die dauerhaft gebunden werden konnten.

Bezogen auf die reaktiven Gruppen ergibt sich folgende Versuchsvorschrift:

Rohenzymlösung: Zellextrakt von *E. coli* MSiftOptR ($A_v=1,7 \cdot 10^6$ U/L $c_{\text{Protein}}=5,6$ g/L), der zu gleichen Teilen mit Chitosanlösung versetzt wird.

Chitosankonzentration: 0,9 % (w/w) Primex-Chitosan, aufgelöst in 0,5 % (w/w) Essigsäure und auf pH 5,5 eingestellt. Da diese Lösung zu gleichen Teilen mit Enzymlösung vermischt wird, befinden sich im Reaktionsansatz 0,45 % (w/w) bzw. 4,5 g/L Chitosan (die Dichteänderung kann hier vernachlässigt werden). Bei einem ungefähren Molekulargewicht von 450 g/mol für den in Abbildung 4.6 auf Seite 55 dargestellten Kettenausschnitt des Chitosans mit drei reaktiven Aminogruppen ergibt sich eine Konzentration von 30 mmol/L an maximal möglichen Reaktionspartnern.

Glutardialdehydkonzentration: 25 mL einer 50 % (w/w) Glutardialdehydlösung zur Vernetzung von 1 L Enzym-Chitosan-Gemisch. Bei einer Dichte von 1,12 kg/L für die Lösung und einem Molekulargewicht von ca. 100 g/mol ergibt sich eine Konzentration an Linkermolekülen von 140 mmol/L bzw. unter Berücksichtigung der beiden Aldehydgruppen eine Konzentration von 280 mmol/L an reaktiven Gruppen. Dies bedeutet, dass fast ein

zehnfacher Überschuss an Reaktionspartnern notwendig ist, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.

8.4.2 Alginatperlen nach dem JetCutter-Verfahren

Unter Berücksichtigung der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurde ein Ansatz von 500 mL Enzym-Chitosanlösung bei den optimierten Bedingungen quervernetzt und vollständig in ein 2,5 %iges Calciumalginatgel eingeschlossen. Es wurde dabei die gleiche Zellextrakt-Enzymlösung wie in den vorherigen Versuchen verwendet.

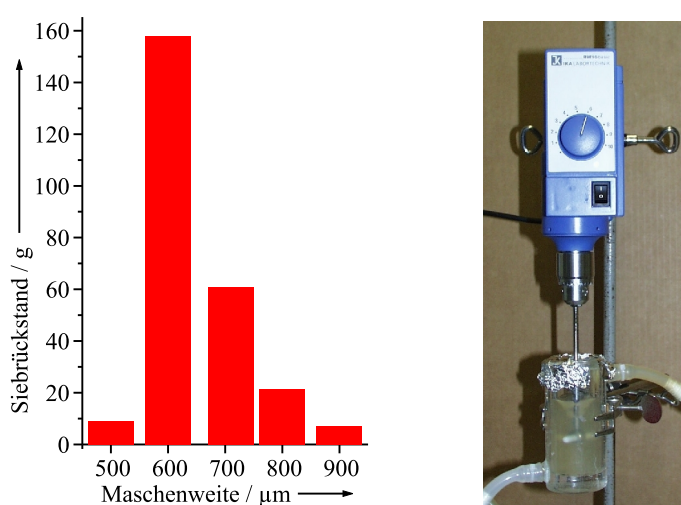


Abbildung 8.4: Darstellung der Partikelgrößenverteilung der nach dem JetCutter-Verfahren hergestellten Calciumalginatperlen (links) und Foto des verwendeten Katalysatorteststandes (rechts).

Um aus der viskosen Alginatlösung kleine Perlen herzustellen, wurde das JetCutter-Verfahren eingesetzt (VORLOP & BREFORD, 1994; PRÜSSE, 1999). Hierbei tritt ein dünner Vollstrahl mit hoher Geschwindigkeit aus einer Düse aus und wird durch ein schnell rotierendes Schneidwerkzeug in identische Segmente zerschnitten, die sich dann während des weiteren Falles aufgrund der Oberflächenspannung zu gleichförmigen Perlen formen, bevor sie in die vernetzende Calciumchloridlösung gelangen.

Mit den im Anhang in Abschnitt B.9.4 auf Seite 123 aufgeführten Geräteeinstellungen sollten sich theoretisch Perlen mit einem Durchmesser von $650\ \mu\text{m}$ ergeben. Wie aus Abbildung 8.4 hervorgeht, fanden sich bei einer Siebanalyse in der Fraktion, die von dem $600\text{-}\mu\text{m}$ -Sieb zurückgehalten wurde, 61,5 % und in der Fraktion größer $710\ \mu\text{m}$ weitere 23,7 % der produzierten 260 g Katalysatorperlen. Diese Verteilung wird der erwarteten Partikelgröße gerecht, Abbildung 8.5 zeigt eine Enzymflocke und eine Perlen.

Für die aufgelösten Perlen wurde eine Aktivität von 446 U/g bestimmt. Dies entspricht einem Anteil von 50,6 % der ursprünglich eingesetzten Aktivität, die dauerhaft in dem Großansatz in das Netzwerk gebunden wurde.

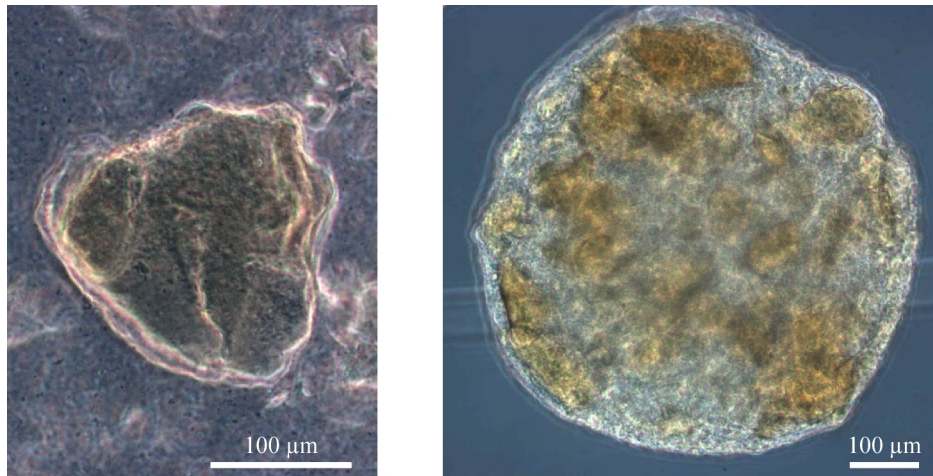


Abbildung 8.5: Mikroskopische Aufnahmen der quervernetzten Inulase (links; 0,45 % Primex-Chitosan, 25 mL/L Glutardialdehydlösung ($c=50$ % (w/w)), Inkubation für 20 h bei 4 °C) und einer Perle von in Calciumalginat (2,5 % Protanal LF20/60, 2 % Calciumchloridlösung) verkapselten Enzymflocken (rechts).

8.4.3 Aktivität der Biokatalysatorperlen

Um den Einfluss der Partikelgröße auf die Aktivität der Katalysatorperlen zu untersuchen, wurden Perlen verschiedener Fraktionen jeweils nacheinander in intakter und in aufgelöster Form entsprechend Abschnitt B.4.4 untersucht.

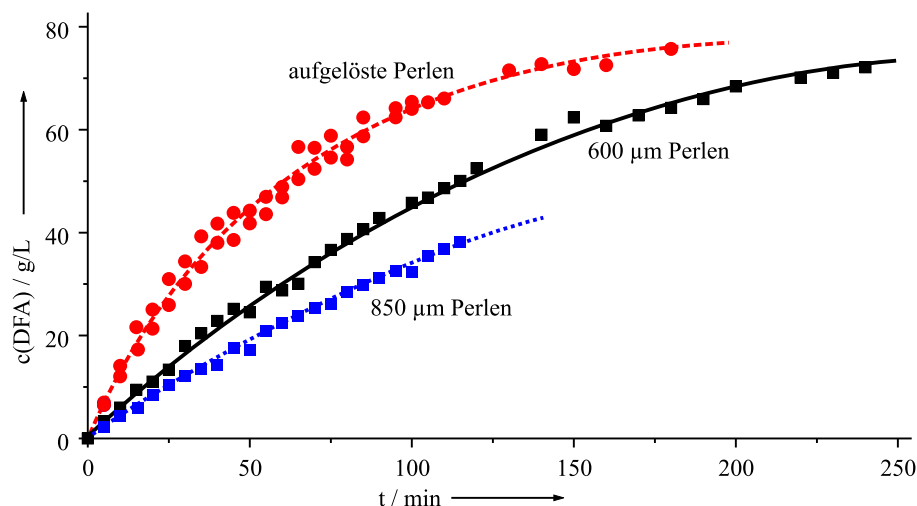


Abbildung 8.6: Einfluss der Perlengröße auf die Aktivität der quervernetzten Inulase (eingesetzt jeweils 500 mg Calciumalginat-Perlen in intakter und anschließend in aufgelöster Form in 55 mL Inulin-Lösung entsprechend Abschnitt B.4.4).

Aus dem in Abbildung 8.6 dargestellten Ergebnis ergibt sich bezogen auf die Anfangsgeschwindigkeiten (Umsatz < 20 %) gemäß Gleichung 4.2 auf Seite 54 für die 600- μ m-Perlen ein Katalysatorwirkungsgrad η von immerhin 0,44, für die größeren 850- μ m-Perlen lediglich 0,34. Für den Umsatz von 50 % benötigt das freie Enzym in diesem Versuchsansatz 41 min, bei den

kleineren Perlen sind es 85 min, bei den größeren 120 min. Damit ergeben sich entsprechend Gleichung 4.2 operationelle Effektivitäten η_{op} von 0,48 bzw. 0,34. Dies bedeutet, dass beim Einsatz der großen Perlen der halbe Umsatz erst nach gut der dreifachen Zeit erreicht wird, bei den kleineren Perlen dauert es noch knapp doppelt so lange im Vergleich zum freien Enzym.

8.4.4 Abschätzung des zu erwartenden Katalysatorwirkungsgrades

Neben der experimentellen Bestimmung des Katalysatorwirkungsgrades η lässt sich dieser auch über die zugrundeliegenden Gesetzmäßigkeiten unter Annahme bestimmter Randbedingungen hinreichend genau abschätzen. Da die beobachtete Verringerung der Aktivität innerhalb der Biokatalysatorperle durch die unzureichende Versorgung der Enzyme mit dem Substrat Inulin hervorgerufen wird, muss zunächst der effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} hierfür bestimmt werden.

Für den Diffusionskoeffizienten in freier Lösung (D_0) findet sich in der Literatur für eine Temperatur von 20 °C (293 K) der Wert $2,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (CHAPLIN, 2001). Die Umrechnung auf den bei der Versuchstemperatur von 50 °C (323 K) gültigen Wert kann unter Zuhilfenahme des bekannten Verhältnisses der dynamischen Viskositäten für Wasser bei den entsprechenden Temperaturen erfolgen (TREYBAL, 1980).

$$D_{0,T_2} = \frac{D_{0,T_1} \cdot T_2 \cdot \eta_{T_1}}{T_1 \cdot \eta_{T_2}} = \frac{2,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s} \cdot 323 \text{ K} \cdot 1,002 \text{ mPa} \cdot \text{s}}{293 \text{ K} \cdot 0,5468 \text{ mPa} \cdot \text{s}} = 4,64 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Die Diffusionsbehinderung innerhalb der Immobilisatperle wird durch das Polymernetzwerk hervorgerufen. Daher geht neben dem Molekulargewichtsparemeter a , der die Größe des diffundierenden Moleküls beschreibt, die Polymerkonzentration V_p (angegeben in kg/L) in die Formel zur Berechnung von D_{eff} ein (WHITE & DORION, 1961).

$$D_{\text{eff}} = D_0 \cdot e^{-a \cdot V_P}$$

Der Parameter a wird anhand der im Anhang auf Seite 125 wiedergegebenen Abbildung C.1 extrapoliert (VORLOP, 1984). Es ergibt sich der Wert 69.

Für die Ermittlung der Polymerkonzentration werden die folgenden Komponenten berücksichtigt:

Alginate	25,0	g/L
Chitosan	4,5	
Protein	2,8	(50,6 % der eingesetzten Proteinmenge)
GA	12,5	
Summe	44,8	g/L bzw. 0,0448 kg/L

Mit diesen Werten errechnet sich

$$D_{\text{eff}} = 4,64 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s} \cdot e^{-69 \cdot 0,0448 \text{ kg/L}} = 2,11 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Das Verhältnis aus der Diffusionsgeschwindigkeit und der Reaktionsgeschwindigkeit wird durch das THIELE-Modul Φ ausgedrückt. Es berücksichtigt zusätzlich die Katalysatorgeometrie und die Reaktionsordnung. Für den vorliegenden Fall kugelförmiger Immobilisate (600- μm -Perlen) mit dem Radius r_P und MICHAELIS-MENTEN-Kinetik gilt die folgende Formel (HARTMEIER, 1986).

$$\Phi = \frac{r_P}{3} \cdot \sqrt{\frac{v_{\text{max}}}{K_M \cdot D_{\text{eff}}}} = \frac{0,03 \text{ cm}}{3} \cdot \sqrt{\frac{4,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/(\text{min} \cdot \text{g})}{2,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L} \cdot 2,11 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}}} = 9,63$$

Für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} wurde ein Wert eingesetzt, der aus der Untersuchung der aufgelösten Alginatperlen (gemessene Aktivität 446 U/g) errechnet wurde.

Das Verhältnis aus der aktuell vorliegenden Substratkonzentration c_0 in dem die Perle umgebenden Medium und der Sättigungskonstante K_M ergibt die dimensionslose Kennzahl β . Die Konzentration c_0 errechnet sich zu 17,8 mmol/L, da im Versuch zu den 50 mL 100-g/L-Inulinlösung noch 5 mL Calciumchloridlösung zugesetzt wurden, sodass eine leichte Verdünnung stattgefunden hat.

$$\beta = \frac{c_0}{K_M} = \frac{17,8 \text{ mmol/L}}{2,3 \text{ mmol/L}} = 7,7$$

Mithilfe des THIELE-Moduls Φ und der Kennzahl β kann der zu erwartende Katalysatorausnutzungsgrad abschließend aus Abbildung C.2 auf Seite 125 abgeschätzt werden (VORLOP, 1984). Tabelle 8.1 stellt die gemessenen und die berechneten Werte gegenüber. Gemessener und berechneter Wert sind in der gleichen Größenordnung, weichen jedoch erheblich voneinander ab. Berücksichtigt man, dass bei der Abschätzung des Molgewichtsparameters a eine erhebliche Fehlerquelle liegt und auch der Einfluss des Polymers in den Perlen nur ungenau bestimmt werden kann, so ist die Übereinstimmung zufriedenstellend.

Tabelle 8.1: Gegenüberstellung gemessener und berechneter Katalysatorausnutzungsgrade.

d_{Perle}	$\eta_{\text{gem.}}$	β	Φ	$\eta_{\text{ber.}}$
600 μm	0,44	7,7	9,63	0,34
850 μm	0,34	7,7	13,65	0,23

8.5 Diskussion und Ausblick

Um das Enzym Inulase II in Hydrogele verkapseln zu können, war es nötig, eine Molekulargewichtsvergrößerung vorzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die von *u0141* bzw. dem

entsprechenden GVO produzierte Inulase II durch den Einsatz von Glutardialdehyd und das Polymer Chitosan wirkungsvoll quervernetzt werden kann.

Die resultierenden Enzymflocken gefällten Enzymes wurden unter Erhalt eines Großteils der Aktivität erfolgreich in eine Curdlanmatrix, in raumtemperatur-geliertes Polyvinylalkoholgel bzw. in Calciumalginatperlen eingeschlossen. Damit wurde Curdlan erstmals als Matrix für die Immobilisierung von Enzymen verwendet. Um die volle Stabilität des Curdlangelates zu erreichen, müsste das einzuschließende Enzym jedoch bis zu einer Temperatur von 80 °C stabil sein. Sollte dies durch das bereits diskutierte gezielte, rationale Enzymdesign erreicht werden, ist zu überprüfen, ob Curdlan tatsächlich eine wirtschaftliche Alternative darstellt oder lediglich von akademischem Interesse bleibt.

Auch im Falle von LentiKats® beschreiben die durchgeführten Versuche erstmals die Verkapselung von Enzymflocken in dieses Hydrogel. Ob sich LentiKats® mit eingeschlossener Inulase II für die Herstellung von DFA III in technischem oder industriellem Maßstab eignen, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Besonders hinsichtlich der Temperatur, bei der die Biokonversion durchgeführt werden kann, ergeben sich Einschränkungen, da LentiKats® bisher nur bis zu einer Temperatur von 60 °C stabil sind. Aufgrund ihrer Geometrie und ihrer extremen mechanischen Stabilität bietet sich für dieses Material der Einsatz einer Wirbelschicht anstelle des sonst häufig verwendeten Festbettes an.

Da im Falle der Versuche mit Calciumalginat von einer Lösung mit sehr hoher Anfangsaktivität ausgegangen wurde, konnten hier Katalysatorpartikel produziert werden, die auch ohne Aufkonzentrierungsschritt eine Anfangsaktivität von ca. 196 U/g (für einen Durchmesser von 600 µm) zeigten. Bei den von NEUBAUER durchgeführten Arbeiten wurde bei der Immobilisierung abgetrennter Biofeuchtmasse (zellgebundene Inulase II aus *A. ureafaciens* AT-CC 21124) eine Aktivität von 77 U/g für Calciumalginatperlen beobachtet. Zur Immobilisierung gelösten Enzymes wurden dort lediglich Vorversuche zur Adsorptionsimmobilisierung auf Bentonit durchgeführt, sodass kein Vergleich möglich ist (NEUBAUER, 1998). Die Überprüfung der experimentell ermittelten Werte durch Berechnung der zu erwartenden Werte lieferte eine zufriedenstellende Übereinstimmung.

Ob Calciumalginat sich für eine Umsetzung von Rohinulinsaft zu DFA III in technischem Maßstab eignet, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Besonders kritisch ist hierbei das im Rohinulinsaft vorliegende Konzentrationsverhältnis von 190/60/3/1 für die ein- und zweiwertigen Ionen $K^+/Na^+/Ca^{2+}/Mg^{2+}$ zu bewerten (ZHAO, 1998), das stark auf die Seite der einwertigen Ionen verschoben ist. Ohne die externe Zugabe von Calciumionen zur Verschiebung der Konzentrationsverhältnisse ist eine schnelle unerwünschte Auflösung der Katalysatorpartikel zu erwarten, wie entsprechende Untersuchungen der Literatur zeigen (VORLOP, 1984).

Kapitel 9

Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die wesentlichen Arbeitsschritte des Screenings nach Mikroorganismen mit bestimmten Stoffwechselleistungen auf Basis von in Hohlkugeln verkapselten Zellen identifiziert und ein Konzept zur technischen Umsetzung erarbeitet. Die angestrebte Screening-Strategie beruht auf der Verkapselung von Einzelzellen in als Mikrobioreaktoren fungierenden Hydrogelhohlkugeln. Durch diesen Schritt werden die mikroskopischen Organismen makroskopisch handhabbar und der Prozess der Selektion bestimmter Organismen damit automatisierbar.

Als Zentralmodul des aufzubauenden Automaten wurde eine zweiarmige Pipettiereinheit ausgewählt, die durch weitere halbfertige Komponenten wie Barcode-Scanner, HPLC-Schaltventile und Kolbenpumpen sowie selbstentworfenen Bauteile zur Bewegung von Perlen und Gefäßen ergänzt wurde. Zur Steuerung aller Bestandteile wurde ein Delphi-Programm erstellt, das es dem Anwender ermöglicht, komplexe Handlungsabläufe zu koordinieren. Das Programm besteht aus drei Hauptsäulen, die parallel arbeiten und die Einheiten Pipettiereinheit, Greifarm und Autosampler verwalten.

Die Herstellung von Hohlkugeln auf Basis von Calciumalginat wurde hinsichtlich der Aufgabenstellung optimiert und Perlen mit und ohne Zellen hergestellt. Der Automat war in der Lage, diese Perlen zu vereinzeln und anhand eines elektronischen Bildes zu unterscheiden und zu sortieren.

Obwohl alle Einzelkomponenten des Automaten realisiert wurden, konnte kein vollständiger Screening-Durchgang abgearbeitet werden, da die Genauigkeit und Fehlertoleranz der aus Eigenbau stammenden Geräte kein autarkes Arbeiten über längere Zeit zuließ. Weiterhin fehlten in der Realisierung periphere Einrichtungen zur Versorgung des Automaten mit Verbrauchsmaterial wie Pipettenspitzen und neuen Inkubationsgefäßen.

Es steht zu erwarten, dass basierend auf den erarbeiteten Ergebnissen die vorgesehene vollständige Automatisierung möglich wird, wenn durchgängig professionelle Komponenten mit ausreichender Genauigkeit verwendet werden. Als vorrangig wünschenswert ist hierbei der Einsatz

eines Roboterarmes zu nennen, der die zentrale Pipettiereinheit unterstützt. Durch den modularen Aufbau ist das entwickelte Steuerprogramm bereits jetzt auf die Integration dieser weiteren Geräte vorbereitet.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Möglichkeit der biotechnischen Herstellung von Difructoseanhydrid III (DFA III), einem Spaltprodukt aus dem Inulinabbau, dem als Zuckeraustauschstoff im Lebensmittelbereich ein erhebliches Marktpotenzial zugerechnet wird.

In einem klassischen Screeningansatz wurde der Stamm *u0141* isoliert, der eine DFA-III-bildende Inulase II exprimiert, die bei einer Temperatur von 60 °C langzeitstabil ist. Der Stamm gehört zu einer bisher nicht beschriebenen Art der Gattung *Arthrobacter*, wie stoffwechselphysiologische Untersuchungen ergaben und durch 16S-RNA-Untersuchungen bestätigt wurde.

Das Enzym aus dem Bakterium wurde aufgereinigt und sein Molekulargewicht (44.700 Da) und sein isoelektrischer Punkt (bei pH 5,3) bestimmt. Bei einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung fällt das Enzym bei einer Sättigungskonzentration von 80 % quantitativ aus, sein pH-Optimumsbereich liegt zwischen 5,0 und 5,3. Der K_M -Wert des Enzymes wurde unter Verwendung von Dahlieninulin mit einer mittleren Molmasse von 5120 Da zu 2,3 mmol/L bestimmt.

Basierend auf dem Inulase-II-Gen wurde parallel in der Arbeitsgruppe ein gentechnisch veränderter Organismus konstruiert, der das Enzym konstitutiv mit hohen Ausbeuten bildet. Bei einer Fermentation dieses GVO unter Verwendung technischer Medienbestandteile wurde bei einer Biotrockenmassekonzentration von 10,5 g/L eine Enzymaktivität von 1,76 Mio U/L erreicht.

Zur Immobilisierung wurde die Inulase II unter Verwendung von Chitosan und Glutardialdehyd quervernetzt. Das Enzym wurde durch den Einsatz von Glutardialdehyd nicht geschädigt und nach Optimierung aller Parameter wurden durchschnittlich 67 % der Enzymaktivität dauerhaft gebunden. Die gebildeten Flocken wurden in die Hydrogele Polyvinylalkohol (PVA), Curdlan und Calciumalginat eingeschlossen. Alle drei Systeme waren grundsätzlich für den Einschluss quervernetzter Inulase II geeignet und zeigten ausreichende Aktivitäten. Für die Immobilisierung eines Großansatzes wurde Calciumalginat als Matrix ausgewählt.

Durch Einsatz des JetCutter-Verfahrens wurden aus einer viskosen Enzympräzipitat-Alginat-Lösung stabile Katalysatorperlen hergestellt, die bei einer engen Partikelgrößenverteilung einen mittleren Durchmesser von 600 μm und eine Anfangsaktivität von 196 U/g aufwiesen. Der Einfluss des Perlendurchmessers auf den Katalysatorwirkungsgrad wurde bestimmt und durch Berechnung der theoretisch zu erwartenden Werte im wesentlichen bestätigt.

Insgesamt wurde ausgehend vom Screening über die Charakterisierung des Stammes und des Enzymes bis hin zur Fermentation eines gentechnisch veränderten Organismus und der Immobilisierung des untersuchten Enzymes die gesamte Bandbreite der Biokonversion von Inulin zu DFA III erfolgreich bearbeitet.

Ergebnisübersichten

A.1 Steuerplatinen für den Screening-Automaten

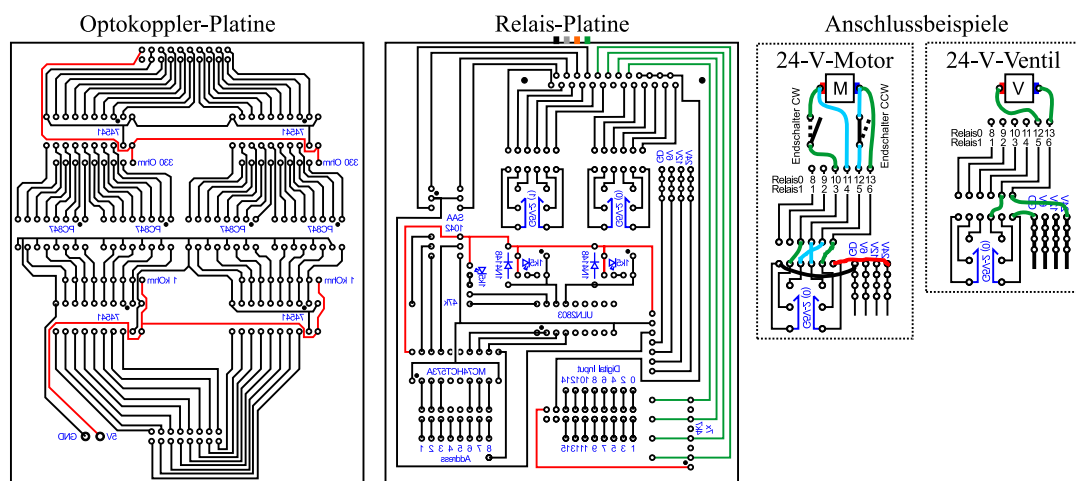


Abbildung A.1: Schaltplan und Bestückung der Optokoppler- und Relaisplatine und Beispiele für den Anschluss eines nachgeschalteten Relais oder eines Schrittmotors. Die Namen der einzelnen Bauteile befinden sich direkt in der Zeichnung, die Funktionsweise ist ausführlich in Abschnitt 2.2.3 auf Seite 12 beschrieben.

A.2 Quelltexte zum Programm „Screening-of-Microbeads“

Die folgende Tabelle listet die für das Programm „Screening-of-Microbeads“ erarbeiteten Quelltextdateien („Units“) auf und gibt Informationen zu ihrem Umfang und Ihrer Funktion.

Unitname	Zeilen	Zeichen	Beschreibung
AppAdmin	86	2.410	Verwaltung verschiedener Ablaufsequenzen
CCDEditSettings	365	12.160	Zugriff auf die CCD-Kamera
CCDTools	175	5.800	Hardwareanbindung Framegrabber-Karte
Confirm	40	625	Bestätigungsdialog bei Rückfragen
DigOut	205	6.240	Hardwareanbindung A/D-Wandler
DigOutThread	175	5.460	Steuerung der Ausgaben auf A/D-Wandler
EditVariables	65	1.660	Dialog zur Bearbeitung von Variablen
GetData	45	810	Abfrage von Daten vom Anwender
Information	40	650	Ausgabe von Hinweisen
MotorEdit	110	3.050	Dialog für Einstellungen an Schrittmotoren
ProgEdit	800	25.960	Dialog zur Erstellung der Befehlsfolgen
ProgThread	650	21.810	Abarbeitung von Befehlsfolgen
RSPPositioning	350	11.180	Dialog zur Einstellung der RSP-Arme
SOMComp	1.680	54.570	alle Komponenten des Programmes
SOMMain	770	27.390	Hauptprogramm
SOMTools	75	1.610	Hilfsroutinen

Dazu kommen noch Formulardateien, die das Aussehen und die Funktionsweise der in Abschnitt 2.3 beschriebenen Dialogmasken, die bei mehreren Komponenten erstellt werden mussten, festlegen.

Eine Wiedergabe der Quelltexte ist an dieser Stelle aus zwei Gründen nicht möglich: Zum einen übersteigt ihr Umfang (>5600 Zeilen) das Maß des möglichen, zum anderen sind zahlreiche Dateien, die unter der Delphi-Entwicklungsumgebung erzeugt werden, nicht als Textdatei ablegbar.

A.3 Screeningergebnisse

Die folgende Tabelle listet die Proben, bei denen bei mindestens einer der untersuchten Temperaturen Wachstum feststellbar war, und ihre Herkunft auf.

Probenname und -herkunft	T/°C	pH/1 ^{a)}	30	45	60 °C ^{b)}	Stämme ^{c)}
versch. Anr.-Kulturen ^{d)} , FAL-Gelände	25		++			1-4, 10-22, 47-52
bew. Inulindicksaft, Nordzucker	20		++			5-9
Ca22, Cakung, Indonesien			+		–	23-31, 53-55
Ca23, Cakung, Indonesien			+		–	32-40, 56-58
Setiabudi, Indonesien			+		–	41-46, 59-64
Kompost von Abfall aus Pferdestall			+			65-68
Kompost von Grasabfällen			++			69-72
angefaulte Dahlienknolle	15		++			37-80
Pferdeapfel			++			81-88
versch. Grassilagen			++			89-94, 124-136
„Grüne Tonne“			++			95-104
div. Luftkeimplatten ^{e)}			++			105-122, 137-168
						182-197, 208-240
Maissilage			++			169-176
Grasboden, Neuseeland			+			178-181
Kompost von Topinambur			+		+	198-207
	20		++			208-219
heiße Quelle, Krýsuvík, Island	60		++	+		220-230
heiße Quelle, Piešťany, Slowakei	45	7,5	+	+	(+)	231-234
heißer Boden, Waimangu, Neuseeland	52				+	235-238
	86				+	239-240
	62				+	241-242
	92				+	243-246
	64				+	247-248
	64				+	249-251
Schlempe, Kartoffelschnapsabfall					+	252
Gülle-Heißfermentation					+	253-255
versch. Biomüllschlempen					+	256-273
Kompost			+	+	(+)	274-290
Quelle, Myadgi, Nepal	43	7,5	++	+	–	nep1-nep77
Quelle, Sinhupalchok, Nepal	44	6,5	++	+	–	nep78-nep115

^{a)} Temperatur und pH-Wert des Probenstandortes (falls verfügbar).

^{b)} Temperaturen, bei denen Wachstum untersucht wurde. Die Angaben –, (+), + und ++ bedeuten kein, geringes, mittleres bzw. starkes Wachstum. Ist das Tabellenfeld leer, so wurde die entsprechende Inkubation nicht durchgeführt.

^{c)} Die Stammbezeichnungen setzen sich zusammen aus dem Kleinbuchstaben „u“ und einer fortlaufenden Zahl bzw. einer Kurzbezeichnung der Probenherkunft. Ist in der Tabelle z.B. „51“ angegeben, so steht dies für den Stamm *u0051*.

^{d)} Anreicherungskultur aus angeschnittenen Knollen von Topinambur und etwas Wasser, zusammen in einem hohem Gefäß als Austrocknungsschutz gelagert.

^{e)} Petrischalen mit JIM2-Festmedium, die für ca. eine Stunde geöffnet ausgelegt wurden.

A.4 Immobilisierungsergebnisse

Einfluss des Glutardialdehyds (vgl. Abschnitt 8.2.1 auf Seite 85)

Enzym / U	Protein / mg	Chitosan / mg	GA / μ L	Präzipitat / U
3,93	2,3	50	0	0,391
3,93	2,3	50	50	3,786
3,93	2,3	50	100	3,251
3,93	2,3	50	200	3,086
3,93	2,3	50	500	3,066

20-mL-Ansatz, Kulturüberstand von *u0141*, Fluka-Chitosan, 50 % (w/w)-GA-Lösung, 12 h Reaktionszeit, 20 °C

Einfluss der Chitosankonzentration und der Reaktionszeit (vgl. Abschnitt 8.2.2 auf Seite 86)

Enzym / U	Protein / mg	Chitosan / mg	GA / μ L	Präz. ₁₆ / U	Präz. ₄₀ / U
7,14	3,2	0	50	0,000	0,000
7,14	3,2	10	50	0,000	0,000
7,14	3,2	20	50	2,469	2,572
7,14	3,2	30	50	3,951	5,484
7,14	3,2	40	50	4,198	5,082
7,14	3,2	55	50	3,971	6,337
7,14	3,2	70	50	4,012	5,175

20-mL-Ansatz, Kulturüberstand von *u0141*, Fluka-Chitosan, 50 % (w/w)-GA-Lösung, 16 bzw. 40 h Reaktionszeit, 20 °C, Aktivität für dreifach gewaschenes Präzipitat

Matrixversuch zum Einfluss der Chitosan- und der Glutardialdehydkonzentration
(vgl. Abschnitt 8.4.1 auf Seite 89)

Enzym / U	Protein / mg	Chitosan / mg	GA / μ L	Netzwerk / U
17.600	56	15	100	2.270
17.600	56	15	200	2.170
17.600	56	15	400	2.670
17.600	56	30	100	3.060
17.600	56	30	200	4.020
17.600	56	30	400	4.270
17.600	56	45	100	4.260
17.600	56	45	200	5.830
17.600	56	45	400	5.430
17.600	56	60	100	3.890
17.600	56	60	200	4.949
17.600	56	60	400	5.500
17.600	56	75	100	3.800
17.600	56	75	200	4.840
17.600	56	75	400	2.900

10-mL-Ansatz, Kulturüberstand von *E. coli* MSiftOptR, Primex-Chitosan, 50 % (w/w)-GA-Lösung, 16 h Reaktionszeit, 4 °C, in Alginatmatrix rückhaltbare Aktivität

Anhang B

Material und Methoden

B.1 Mikro-MPN-Versuche mit *Enterococcus faecium*

Zur Untersuchung der Eignung der Pipettiereinheit für die Durchführung von Mikro-MPN-Bestimmungen wurden ein *Enterococcus faecium*-Stamm, selektives Enterokokken-Medium und 96-Loch-Platten mit rundlichen Böden der Wells verwendet. Durch das im Medium enthaltene Triphenyltetrazoliumchlorid färben sich die Zellen rot und lassen sich gut detektieren.

Der grundsätzliche Ansatz eines Versuches bestand aus:

- Befüllung der Wells mit Medium (max. 200 μL)
- Herstellung einer Verdünnungsreihe der Zellen in physiologischer Kochsalzlösung (entweder automatisch in Wells der Mikrotiterplatte bzw. extern in 1,5-mL-Reaktionsgefäßen unter einer Sterilwerkbank)
- Beimpfung des Mediums und Inkubation für 24 h bei 37 °C
- Auswertung durch Zählung bewachsener und unbewachsener Wells

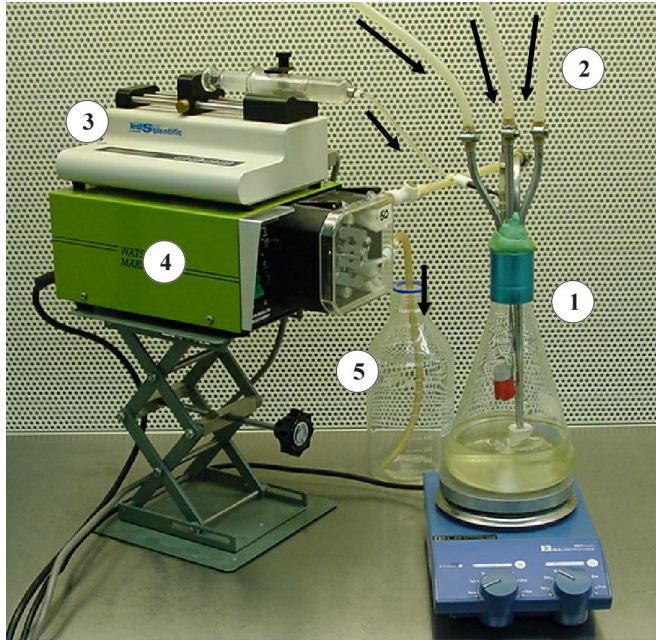
Enterococcus-Medium 20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Glucose, 4 g/L Na_2HPO_4 , 0,4 g/L Natriumazid, 0,1 g/L 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
der pH-Wert 6,0 wurde mit 1 mol/L Natronlauge eingestellt
das Medium wurde für 30 min bei 100 °C sterilisiert

B.2 Arbeiten mit Mikrobioreaktoren

B.2.1 Herstellung von Alginathohlkugeln

Eine Calciumchloridlösung, deren Viskosität durch Zugabe von Carboxymethylcellulose erhöht wurde, wurde unter Rühren (300 Upm) in Natriumalginatlösung getropft. Nach einer Vernet-

zungszeit von 15 min wurde die Alginatlösung entfernt und die gebildeten Perlen zweimal für 10 sec mit Leitungswasser gewaschen. Abschließend wurden die Perlen in Calciumchloridlösung aufgenommen und für 10 min nachgehärtet.



- ① Kulturkolben mit Aufsatz drehbarer Becher (rot) als Bypass Teflonsiebvorsatz vor Absauger
- ② dreifacher Zulauf (Wasser, CaCl_2 , Medium)
- ③ Kolbenpumpe mit Glasspritze
- ④ Schlauchpumpe zum Abziehen
- ⑤ Abfallgefäß

Abbildung B.1: Immobilisierungsapparatur zum aseptischen Herstellen von Hohlkugeln auf Basis von Alginate; im Bild nicht dargestellt sind die oben an den Schläuchen befindlichen Vorlagegefäße.

Um die Perlen aseptisch herstellen zu können, wurde eine Immobilisierungsapparatur konstruiert, die direkt auf den Hals eines 1-L-Kulturkolbens aufgesetzt wurde. Wie in Abbildung B.1 zu sehen ist, konnten verschiedene Vorlagegefäße, eine Kolbenpumpe (Model 100, kd-Scientific, Frankreich) mit autoklavierbarer 20-mL-Glasspritze und eine Schlauchpumpe (502S/50, Watson-Marlow Bredel, Cheltenham, Großbritannien) zum Abziehen der Flüssigkeiten angeschlossen werden. Um die gebildeten Perlen nicht mit in die Schlauchpumpe zu saugen, wurde ein Siebvorsatz aus Teflon verwendet. Während des gesamten Herstellungsvorganges stand der Kulturkolben auf einem Magnetrührer (RETbasic, IKA Werke GmbH & Co., Staufen, 300 Upm, Trombe auf halber Höhe des Flüssigkeitsspiegels).

Alle Lösungen wurden vor dem Gebrauch für 10 min bei 121 °C autoklaviert. Die Calciumchloridlösung wurde vor dem Vertropfen mit den einzuschließenden Zellen versetzt.

Nach der Herstellung der Perlen wurde als Kultivierungsmedium JIM2 (siehe Abschnitt B.6.2) zugesetzt und die Immobilisierungsapparatur durch eine Standardüberfallkappe ausgewechselt, sodass die Inkubation direkt in dem auch zuvor verwendeten Kulturkolben erfolgen konnte.

CMC-CaCl₂-Lösung	20 g/L Blanose CMC (Hercules, Kopenhagen, Dänemark) 15 g/L CaCl ₂ ·2 H ₂ O 100 µL/L 1 mol/L NaOH-Lösung
Alginatlösung	9 g/L Natriumalginat (Protanal LF20/60, FMC Biopolymer AS, Haugesund, Norwegen) 100 µL/L 1 mol/L NaOH-Lösung
Waschwasser	Leitungswasser
Calciumchloridlösung	10 g/L CaCl ₂ ·2 H ₂ O

B.2.2 Bestimmung der Stabilität von Hohlkugeln

Jeweils zehn Hohlkugeln wurden mit einem flachen Spatel auf dem Wägeteller einer Laborwaage zerdrückt. Es wurde das Gewicht notiert, bei dem die Hohlkugel zerplatzte. Der Vorgang musste schnell erfolgen, um zu verhindern, dass das in den Perlen befindliche Wasser ausgepresst und so das Ergebnis verfälscht wurde.

B.3 Stoffanalytische Methoden

B.3.1 DFA-III-Analytik mittels HPLC

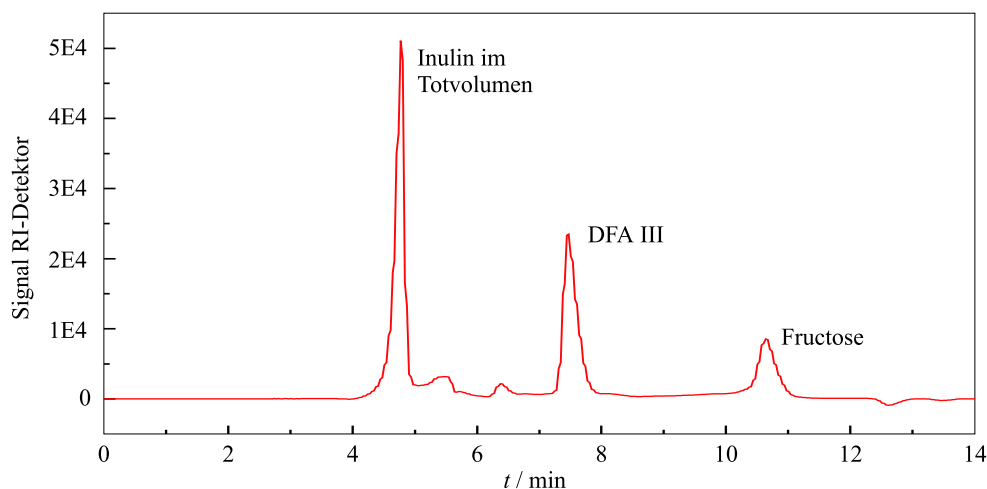
Die Analyse der bei der Inulinspaltung auftretenden Produkte – im wesentlichen DFA, Fructose und Glucose – erfolgte über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („high performance liquid chromatography“, HPLC) mit einer Säule auf Polystyrolvinylbenzolbasis in Natriumform. Um die Hydrolyse glykosidischer Bindungen bei der Säulenpassage zu verhindern, wurde abweichend von der Herstellerempfehlung, reines Wasser als Eluent zu verwenden, eine verdünnte Natronlauge eingesetzt. Die Zugabe eines Komplexbildners verhinderte die Anlagerung zweiwertiger Ionen auf dem Säulenmaterial.

Die verwendete Säule trennt gelöste Stoffe nach dem Größenausschlussprinzip („size exclusion chromatography“, SEC). Je kleiner ein Molekül ist, desto länger ist seine Retentionszeit. Geladene Teilchen werden überhaupt nicht zurückgehalten, sondern passieren die Trennstrecke genau wie länger-kettige Inulinfragmente im Totvolumen. Erst Oligofructosen mit einem Polymerisationsgrad von DP4 und kleiner werden aufgetrennt und als einzelne Peaks im Chromatogramm sichtbar.

Das Detektorsignal wurde elektronisch aufgezeichnet und die zu analysierenden Substanzen anhand ihrer Retentionszeit detektiert. DFA passierte den Detektor wie in Abbildung B.2 zu sehen nach 7,6 min, die gesamte Messung einer Probe dauerte maximal 14 min. Das Detektorsignal (Peakfläche) war über drei Dekaden (z.B. 0,1 g/L bis 10 g/L für DFA) linear zur Konzentration des Stoffes. Das System wurde regelmäßig mit geeigneten Standardlösungen kalibriert. Der Fehler lag bei weniger als 1 % Abweichung bei Mehrfachmessungen derselben Probe; Messungen im Rahmen von Versuchen wurden daher in Einfachbestimmung ausgeführt.

Tabelle B.1: Geräte und Trennbedingungen für die Analytik von DFA III, Glucose und Fructose.

Trennsäule	CHO611 (InterAction Chromatography, San Jose, USA), 4,6 x 300 mm
Entgaser	DGU-3A (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg)
Autosampler	$v=20\ \mu\text{L}$, Basic Marathon (Spark Holland Instrumenten, Emmen, Niederlande)
Pumpe	$\dot{v}=0,5\ \text{mL/min}$, LC-10AT (Shimadzu)
Säulenofen	$T=80\ ^\circ\text{C}$, CTO-10A (Shimadzu)
Detektor	Brechungsindexmessung, $T=60\ ^\circ\text{C}$, RID-10A (Shimadzu)
Auswertung	Systemcontroller SCL-10A $_{vp}$ (Shimadzu)
	Software-Paket Class-vp v5.03 (Shimadzu)

**Abbildung B.2:** Beispielchromatogramm der DFA-Bestimmung; Parameter wie in Tabelle B.1 angegeben.

Die Proben wurden vor der Messung zur Abtrennung ungelöster Bestandteile zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, 20.800 g , 5 min, 20 °C) und mit Laufmittel geeignet verdünnt.

Laufmittel 5 mmol/L Natronlauge, 5 mmol/L Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
verwendetes Wasser HPLC-grade (Milli-Qplus 185, Millipore Corp., Bedford, Massachusetts)

B.3.2 Bestimmung des Polymerisationsgrades von Inulin

Da der mittlere Polymerisationsgrad von Inulin nicht direkt über eine Messung zugänglich ist, wurde das Inulin durch das Enzym Inulase I zunächst vollständig hydrolysiert. Aus dem Konzentrationsverhältnis der Produkte Glucose und Fructose ergibt sich dann DP:

$$DP = \frac{c_{\text{Fructose}}}{c_{\text{Glucose}}} + 1$$

Zur Hydrolyse wurden zu 990 μL Inulinlösung 10 μL Novozym 230 (Novozyme A/S, Bagsværd, Dänemark) gegeben und für 60 min bei 50 °C inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung für Glucose und Fructose erfolgte entsprechend Abschnitt B.3.1.

B.3.3 FOS-Analytik mittels Dionex-HPLC

Fructooligosaccharide als mögliche Spaltprodukte des Inulins wurden im Einzelfall über eine spezielle Kohlenhydrat-HPLC-Anlage (Dionex Corp., Sunnyvale, Kalifornien) analysiert. Die Trennung erfolgte in Gegenwart eines Laufmittelgradienten bei einem Fluss von 0,8 mL/min über eine CarboPac PA1-Säule (4 x 250 mm) mit entsprechender Vorsäule (4 x 50 mm). Die einzelnen Substanzen wurden mit einem gepulstem elektrochemischen Detektor nachgewiesen und anhand ihrer Retentionszeit identifiziert. Um Peaks bestimmten Substanzen zuordnen zu können, wurde Raftilose® (Raffinerie Tirlemontoise S. A., Tienen, Belgien) als Vergleichsstandard verwendet.

Laufmittel (A) 0,1 mol/L Natronlauge
(B) 1 mol/L Natriumacetat, 0,1 mol/L Natronlauge

B.3.4 HPLC-Analytik organischer Säuren

Die während der Fermentation des gentechnisch veränderten *E. coli*-Stammes auftretenden organischen Säuren wurden mittels HPLC untersucht. Die Proben wurden vor der Messung zur Abtrennung ungelöster Bestandteile zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, 20.800xg, 5 min, 20 °C) und mit Laufmittel geeignet verdünnt.

Tabelle B.2: Geräte und Trennbedingungen für die Analytik organischer Säuren

Trennsäule	HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien), 4,6 x 300 mm
Entgaser	ERC3114 (ERC Corp. Japan)
Autosampler	$v=20\ \mu\text{L}$, Basic Marathon (Spark Holland Instrumenten, Emmen, Niederlande)
Pumpe	$\dot{v}=0,5\ \text{mL/min}$, LC-10AT (Shimadzu Deutschland GmbH)
Säulenofen	$T=80\ ^\circ\text{C}$, CTO-10A (Shimadzu)
Detektor 1	Brechungsindexmessung, $T=60\ ^\circ\text{C}$, RID-6A (Shimadzu)
Detektor 2	UV-Absorption, $\lambda=280\ \text{nm}$, SPD-6A (Shimadzu)
Auswertung	CBM-10A (Shimadzu) Software-Paket Class-LC10 Version 1.6 (Shimadzu)

Die Identifikation der organischen Säuren erfolgte über ihre Retentionszeit, die quantitative Auswertung anhand von Standards über die Peakflächen der Chromatogramme.

Laufmittel 5 mmol/L H_2SO_4
verwendetes Wasser HPLC-grade (Milli-Qplus 185, Millipore Corp., Bedford, Massachusetts)

B.3.5 Fettsäureanalyse mittels FAME-GC

Um entscheiden zu können, ob es sich bei Isolaten um verschiedene Stämme oder nur um Re-Isolate handelte, wurde eine Bestimmung der Fettsäuremuster durchgeführt. Durch die fol-

genden Arbeitsschritte wurden die Fettsäuren der Lipidschicht hydrolisiert, zu Methylestern umgesetzt und abschließend extrahiert. Das stammcharakteristische Peakmuster wurde durch GC-Analyse erhalten.

Die Biomasse aus dem zweiten Quadranten von Vereinzelungsausstrichen (vier Quadranten) der in Frage kommenden Bakterien wurde mit einer Impföse abgeerntet, in einem Glasröhrchen mit Teflonkappe in 1,0 mL Reagenz 1 aufgenommen und für 10 s auf einem Vortexschüttler gemischt. Zur Verseifung wurde das Gemisch für 5 min bei 100 °C inkubiert, nochmals für 10 s auf einem Vortexschüttler durchmischt und für weitere 25 min bei 100 °C belassen.

Nach dem Abkühlen wurden 2 mL Reagenz 2 zugesetzt, für 10 s durchmischt und die Methylierungsreaktion für 10 ± 1 min bei 80 ± 1 °C durchgeführt. Anschließend wurde auf Eis abgekühlt.

Die Extraktion erfolgte durch Zugabe von 1,25 mL Reagenz 3 und Mischung für 15 min im Überkopfschüttler; anschließend wurde die untere wässrige Phase verworfen.

Als Waschgang wurden 3 mL Reagenz 4 zugesetzt und 10 min im Überkopfschüttler durchmischt. Nach der Phasentrennung (Labofuge GL, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau 1.000 Upm, 2 min) wurden zwei Drittel der organischen Phase in GC-Vials überführt und im Gaschromatographen vermessen.

Reagenz 1 45 g Natriumhydroxid (ACS); 150 mL Methanol (HPLC-grade); 150 mL Wasser

Reagenz 2 325 mL 6,00 mol/L Salzsäure; 275 mL Methanol (HPLC-grade)

Reagenz 3 200 mL Hexan (HPLC-grade); 200 mL tert.-Butylmethylether (HPLC-grade)

Reagenz 4 10,8 g Natriumhydroxid (ACS); 900 mL Wasser

B.3.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von (SMITH *et al.*, 1985). In Anwesenheit von Peptiden werden zweiwertige Kupferionen reduziert und können anschließend mit Bicinchinonsäuremolekülen einen Chelatkomplex bilden. Hierbei verfärbt sich eine ursprünglich hellgrüne Lösung violett. Diese Verfärbung kann photometrisch quantifiziert werden.

Zum Nachweis wurden 900 μ L frisch angesetzte Reaktionsmischung mit 100 μ L Proteinprobe vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei -20 °C eingefroren, um die Reaktion zu stoppen. Nach dem Auftauen und Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=562$ nm gemessen (550 SE UV/Vis Spektrophotometer, PerkinElmer Inc., Boston, Massachusetts). Als Referenz wurde ein Ansatz aus Reaktionsmischung und Wasser verwendet.

Die Kalibrierung erfolgt durch Messung einer Verdünnungsreihe (0,001 g/L bis 1 g/L) eines Rinderserumalbumin-Standards (Best.-Nr. P-0914, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri). Bei Bedarf wurden die Proben verdünnt, um in den Messbereich zwischen 0,1 und 0,5 g/L zu gelangen.

Reaktionsmischung 50 Teile Bicinchinonsäurelösung (Best.-Nr. B-9643, Sigma Chemicals)
1 Teil 4 % CuSO₄·2 H₂O Lösung

B.4 Bestimmung der Inulase-II-Aktivität

B.4.1 Standardaktivitätstest

Die Aktivität des Enzymes Inulase II wurde über die Produktbildungsrate bestimmt. Hierzu wurden 900 µL Inulinlösung mit 100 µL Enzymlösung vermischt. Bei Versuchen, in denen in der Enzymlösung bereits DFA enthalten war (Enzym aus dem Kulturüberstand des Wildtyps) wurde sofort eine Probe zur Bestimmung der Anfangskonzentration $c_{\text{DFA},0}$ entnommen und inaktiviert (5 min im Wasserbad bei 100 °C). Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 30 min bei 50 °C¹ inkubiert und dann ebenfalls für 5 min auf 100 °C erhitzt, um die Reaktion zu stoppen. Die Endkonzentration $c_{\text{DFA},30}$ wurde per HPLC entsprechend Abschnitt B.3.1 bestimmt und die Enzymaktivität EA in EC-Units (1 EC-Unit=1 µmol/min) nach folgender Formel berechnet:

$$EA = \frac{(c_{\text{DFA},30} - c_{\text{DFA},0}) \cdot 10^6}{MW_{\text{DFA}} \cdot t} = \frac{(c_{\text{DFA},30} - c_{\text{DFA},0}) \cdot 10^6}{324 \text{ g/mol} \cdot 30 \text{ min}}$$

Um während des gesamten Tests Substratsättigung zu gewährleisten, wurde nur soviel Aktivität eingesetzt, dass der Umsatz unterhalb von 15 % des Vollumsatzes lag. Das Enzym wurde ggf. mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

Für die Versuche zur Temperaturschädigung wurde die Enzymlösung im Wasserbad bei der gewünschten Temperatur inkubiert und anschließend die verbleibende Aktivität unter den beschriebenen Standardbedingungen bestimmt.

Inulinlösung 100 g/L Inulin, 50 mmol/L 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure (MES-Puffer)
 pH -Wert 5,5 eingestellt mit 1 mol/L Natronlauge

B.4.2 Untersuchung bei verschiedenen pH-Werten

Die Versuche zur pH -Abhängigkeit der Aktivität wurden mit drei verschiedenen Puffersystemen durchgeführt, die anstelle des MES-Puffers für die Zubereitung der Inulinlösung verwendet wurden.

¹Die Temperatur von 50 °C wurde gewählt, um den Vergleich mit früheren Arbeiten zu ermöglichen (WALTER *et al.*, 1995).

Inulinlösung		100 g/L Inulin in Puffer
Citratpuffer	pH 3	2,32 g Citronensäure-Monohydrat, 0,87 g NaCl, 10,3 mL 0,5 mol/L NaOH
	pH 4	2,94 g Citronensäure-Monohydrat, 0,64 g NaCl, 34,0 mL 0,5 mol/L NaOH
	pH 5	2,53 g Citronensäure-Monohydrat, 49,1 mL 0,5 mol/L NaOH
	pH 6	3,13 g Citronensäure-Monohydrat, 79,8 mL 0,5 mol/L NaOH
Phosphatpuffer	pH 5	2,25 g KH_2PO_4 , 0,02 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	pH 6	2,02 g KH_2PO_4 , 0,33 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	pH 7	0,94 g KH_2PO_4 , 1,74 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	pH 8	0,08 g KH_2PO_4 , 2,86 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Boratpuffer	pH 8	2,38 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, 10,25 mL 1 mol/L HCl
	pH 9	2,38 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, 2,30 mL 1 mol/L HCl
	pH 10	2,38 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, 18,3 mL 0,5 mol/L NaOH
		jeweils aufgefüllt auf 250 mL mit deion. Wasser

B.4.3 Test für Enzyme aus gentechnisch veränderten Organismen

Mit dem zu untersuchenden Stamm wurden 5 mL LB-Medium (mit Ampicillin, siehe Abschnitt B.7.1) angeimpft und für 16 h bei 37 °C und 170 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden direkt in den Kulturröhrchen pelletiert (Labofuge mit Schwenkrotorbecher 2150, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, 10 min, 3.500 Upm), in 5 mL gekühlter physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (Sonoplus HD 200, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Sonotrode KE76, 1 min, Intervallanteil 50 %). Bei Vorversuchen war diese Ultraschallbehandlung als ausreichend für einen quantitativen Zellaufschluss ermittelt worden.

Dann wurden 1 mL der aufgeschlossenen Zellsuspension abgenommen, zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, 20.800xg, 5 min, 4 °C), abschließend vom Überstand 100 µL in 1 mL Inulinlösung überführt und dem zuvor beschriebenen Aktivitätstest unterworfen.

Bei sehr hohem Expressionsniveau wurden die Zellen nach der Kultivierung noch vor dem ersten Pelletierungsschritt geeignet mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Abhängig vom Einzelversuch wurde neben den aufgeschlossenen Zellen auch der Überstand der Zellen auf Inulaseaktivität untersucht.

B.4.4 Aktivitätstests für Alginatimmobilisate

Von den zu untersuchenden Perlen wurde die anhaftende Feuchtigkeit abgesaugt und auf der Feinwaage Proben in der Größenordnung von 0,5 g abgewogen. Der in Abbildung 8.4 auf Seite 91 dargestellte Perlenteststand wurde mit 50 mL Inulinlösung (siehe Abschnitt B.4.1) und 5 mL Calciumchloridlösung befüllt, stark gerührt (RW16 basic, IKA Werke GmbH & Co., Staufen,

Stufe 6, Rührstab 2,5 cm Länge) und über den Doppelmantel auf 50 °C temperiert. Nach Zugabe der Katalysatorperlen wurde nach jeweils 5 min eine Probe von 100 µL entnommen und entsprechend Abschnitt B.3.1 mit 900 µL Laufmittel versetzt, aufgekocht und der DFA-III-Gehalt bestimmt.

Zur Bestimmung der Aktivität ohne Diffusionseinflüsse durch die Alginatmatrix wurden die Perlen anschließend über ein Sieb mit 200 µm Maschenweite vollständig abgetrennt und für 30 min unter gelegentlichem Bewegen in 5 mL Citratpuffer aufgelöst. Die so erhaltene Lösung wurde anschließend analog mit 50 mL Inulinlösung im Teststand untersucht.

Calciumchloridlösung 2 % (w/w) CaCl₂

Citratpuffer 100 mmol/L Natriumcitrat, 100 mmol/L NaCl
der pH-Wert 6,0 wurde mit 1 mol/L Natronlauge eingestellt

B.5 Mikroskopische Untersuchungen

Bakterien und Immobilisate wurden zur Kontrolle und zur Charakterisierung mikroskopisch untersucht. Abhängig vom Objekt wurde eine Stereolupe (STEMI SV8, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena; Kamera TK-1070E, JVC Victor Company of Japan Ltd., Yokohama, Japan) bzw. ein Stereomikroskop (Axioplan, Carl Zeiss Jena GmbH; Kamera Colorview 12, Soft Imaging System GmbH, Münster) verwendet. Die Bildaufnahme und -auswertung erfolgte digital über das Programm **analySIS 3.0** (Soft Imaging System GmbH).

Zur Fixierung beweglicher Bakterien wurde ein Objektträger mit einer Seite kurz in aufgekochte Agaroselösung getaucht. Nach dem Antrocknen des Agarosefilmes nahm dieser die Flüssigkeit einer aufgetragenen Probe auf, sodass die Mikroorganismen anschließend alle in einer Schärfebene lagen.

Agaroselösung 0,7 % (w/w) Agarose

B.6 Arbeiten mit DFA-III-bildenden Mikroorganismen

B.6.1 Inkubationsbedingungen

Mesophile Kulturen wurden in einem Schüttelschrank (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert, bei flüssigen Medien bei einer Schüttelfrequenz von 120 Upm. Ab Temperaturen von 60 °C wurde ein Wasserbad-Rundschüttler (Aquatron, Infors AG) verwendet, da andernfalls die Medien zu schnell austrockneten.

B.6.2 Inulinmedium JIM2

Zur Kultivierung inulinverwertender Bakterien wurde mit JIM2 ein phosphatgepuffertes Medium verwendet, das Inulin als hauptsächliche Kohlenstoff- und Energiequelle enthält. Das Medium wurde in flüssiger und durch Zusatz von Agar Agar auch in fester Form verwendet.

(A)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2,0 g	
	KH_2PO_4	1,0 g	in 200 mL H_2O
(B)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 g	
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g	
	Hefeextrakt	0,25 g	
	DSM-SL-144	10 mL	
	DSM-VL-141	10 mL	
	Agar Agar	17,0 g	in 500 mL H_2O
(C)	Inulin	10,0 g	
	0,1 mol/L NaOH-Lsg.	20 μL	in 300 mL H_2O
(D)	Cycloheximid	60 mg	in 5 mL H_2O

Lösungen (A), (B) und (C) wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert und aseptisch vereinigt.

Lösung (D) wurde nach dem Abkühlen sterilfiltriert zugesetzt.

Die verwendeten Spurenelement- und Vitaminlösungen entstammen dem Medienkatalog der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig)

Spurenelementlösung DSM-SL-144

Nitrilotriessigsäure	12,8 g
NaCl	1,0 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	170 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	100 mg
ZnCl_2	100 mg
CuCl_2	20 mg
H_3BO_3	10 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	26 mg
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	20 mg
H_2O	1000 mL

Vitaminlösung DSM-VL-141

Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxin-HCl	10,0 mg
Thiamin-HCl $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5,0 mg
Riboflavin	5,0 mg
Nicotinsäure	5,0 mg
D-Calciumpantothenat	5,0 mg
p-Aminobenzoessäure	5,0 mg
Vitamin B12	0,1 mg
Liponsäure	5,0 mg
H_2O	1000 mL

Die Nitrilotriessigsäure wurde zunächst gelöst, der pH-Wert 6,5 mit 1 mol/L Kaliumhydroxidlösung eingestellt.

B.6.3 Inulinmedium JIM5

Für die Inkubation von in Mikrobioreaktoren auf Basis von Calciumalginat eingeschlossenen Bakterien wurde ein Medium verwendet, das mit MES gepuffert war, da die Alginatmembran in JIM2 nicht stabil ist.

- (A) 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure 9,5 g in 400 mL H₂O
der pH-Wert 6,5 wurde mit 1 mol/L Natronlauge eingestellt
- (B) CaCl₂·2 H₂O 1 g
MgSO₄·7 H₂O 0,5 g
Hefeextrakt 1 g in 150 mL H₂O
- (C) Na₂HPO₄·2 H₂O 0,5 g
DSM-SL-144 10 mL
DSM-VL-141 10 mL in 150 mL H₂O
- (D) Inulin 10,0 g
0,1 mol/L NaOH-Lsg. 20 µL in 300 mL H₂O

Lösungen (A) bis (D) wurden separat für 20 min bei 121 °C autoklaviert und anschließend aseptisch vereinigt. Die Spurenelementlösung DSM-SL-144 und die Vitaminlösung DSM-VL-141 wurden entsprechend Abschnitt B.6.2 angesetzt.

B.6.4 Screening nach DFA-III-bildenden Bakterien

Jeweils 2 g Probenmaterial wurden in 20 mL Leitungswasser aufgenommen und für 20 min im Überkopfschüttler durchmischt, um die Organismen vom Träger abzulösen. Von den so erhaltenen Ausgangslösungen wurden Verdünnungsreihen in Zehnerschritten in physiologischer Kochsalzlösung angelegt und je 100 µL auf JIM2-Agarplatten (siehe Abschnitt B.6.2) ausgebracht.

Nach Inkubation bei 30 °C bzw. 45 °C und/oder 60 °C wurden einzelstehende Kolonien auf neuen Platten ausgestrichen und dann die so isolierten Stämme auf DFA-III-Bildung hin getestet. Hierzu wurde frische Zellmasse steril mit einer Impföse in flüssigem JIM2-Medium suspendiert und der Ansatz erneut bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Im Verlauf der folgenden 24 h wurde in regelmäßigen Abständen viermal der DFA-III-Gehalt entsprechend Abschnitt B.3.1 analysiert. Die mehrfache Analyse war notwendig, da DFA III zumeist als intermediäres Produkt gebildet wird, das von den Mikroorganismen auch wieder abgebaut wird. Deshalb ist eine einzige Untersuchung nur am Ende der Inkubation unzureichend.

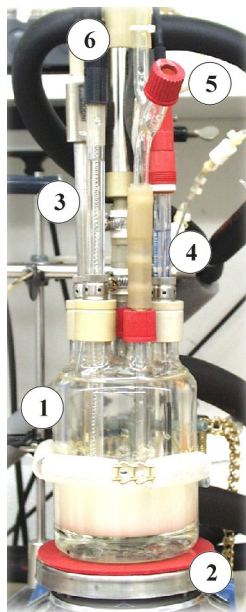
Für den noch höheren Temperaturbereich wurde JIM2-Flüssigmedium mit Probenmaterial beimpft, bei 80 °C inkubiert und regelmäßig ohne vorherige Stammissolierung auf DFA-III-Bildung analysiert.

Um den Materialbedarf zu senken, wurden die Versuche bis 45 °C vollständig in Mikrotiterplatten (sterile 24-Loch-Platten, 3 mL Volumen pro Vertiefung) durchgeführt, für die Versuche bei höheren Temperaturen wurden Erlenmeyerkolben in einem Wasserbad-Rundschüttler eingesetzt, um die Austrocknung der Kolben während der Inkubation zu verhindern.

B.6.5 Kultivierung im 0,5-L-Fermenter

Die Kultivierung des DFA-III-bildenden Stammes *u0141* erfolgte in einem Glaseigenbau mit folgender Ausstattung und Parametrierung:

- 0,5-L-Fermenter, Magnetrührer (② RETbasic, IKA Werke GmbH & Co., Staufen, 400 Upm), Probennahme über Steigrohr mit Septum (⑤) mit Spritze und Kanüle (0,6 x 60 mm)
- Temperierung über Doppelmantel und Thermostat, $T=30^{\circ}\text{C}$
- pO_2 -Sonde mit Messverstärker, Regler und Anschluss an die Hausdruckluft; Sollwert 80 % Sättigung
- pH -Elektrode und Redox-Elektrode, jeweils mit Messverstärker
- Datenaufnahme und -visualisierung über die Software DasyLab 3.5 (DATALOG Systeme zur Messwerterfassung GmbH & Co. KG, Mönchengladbach)



- ① Fermentationsvolumen
- ② Magnetrührer
- ③ Sauerstoff- und Redox-Elektrode
- ④ pH -Elektrode
- ⑤ Steigrohr zur Probennahme
- ⑥ Abluftkühler

Abbildung B.3: Foto des Kleinfärmenters.

Die Fermentation wurde mit JIM2-Medium durchgeführt und mit 5 % einer Übernackkultur angeimpft. Von den regelmäßig entnommenen Proben wurden die folgenden Werte bestimmt:

- Trübung als optische Dichte OD_{605} mit einem Spektralphotometer (PM2A, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, $\lambda=605\text{ nm}$) gegen Wasser als Referenz
- der Gehalt an gebildetem DFA III
- die Proteinkonzentration im Medium
- die Inulase-II-Aktivität im Überstand

B.6.6 Stoffwechselphysiologische Untersuchungen

Prüfung auf Katalaseaktivität

Auf einem Objektträger wurde eine einzelne Kolonie mit einem Tropfen 3 % H_2O_2 -Lösung verrieben. Die Entwicklung feiner Gasblasen zeigte Katalaseaktivität an.

Prüfung auf Oxidaseaktivität

Auf einem mit frisch angesetzter TPMD-Lösung getränkten Streifen Filterpapier wurde mit einer Platinöse Bakterienmasse verrieben. Bei oxidasepositiven Organismen setzte innerhalb von 10 s eine Blaufärbung ein.

TPMD-Lösung 50 mg N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenyldiammoniumdihydrochlorid in 10 mL H_2O

Prüfung auf Substratverwertung

Das Wachstum wurde in JIM2-Basismedium mit zugesetzten Einzelsubstraten überprüft. Die Versuche wurden in 100-mL-Kulturkolben mit je 25 mL Medium durchgeführt.

JIM2-Basismedium JIM2-Medium entsprechend Abschnitt B.6.2, allerdings ohne Zusatz von Inulin

Einzelsubstrate Kohlenhydrate wurden sterilfiltriert zu einer Endkonzentration von 5 g/L zugesetzt

Prüfung auf Stärkehydrolyse

Die Hydrolyse von Stärke wurde durch das Ausbleiben der Jod-Stärke-Reaktion nachgewiesen. Hierzu wurden beimpfte Stärkeagarplatten nach der Inkubation mit Lugolscher Lösung überschichtet. Helle Zonen um die Kolonien zeigten Stärkehydrolyse an.

Stärkeagar 5 g/L Pepton aus Casein, 1,5 g/L Fleischextrakt, 2 g/L lösliche Stärke, 12 g/L Agar Agar
der pH-Wert 7,2 wurde mit 2 mol/L Natronlauge eingestellt

Prüfung auf Gelatinehydrolyse

Kulturplatten mit Nährgelatinemedium (Fertigmedium) wurden nach Vorschrift hergestellt (Autoklavierbedingungen: 30 min bei nur 105 °C!) und an mehreren Stellen beimpft. Nach mehrtägiger Inkubation wurden die Platten auf Mediumsverflüssigung im Umkreis um die Kolonien untersucht.

Prüfung auf Cellulosehydrolyse

Die Hydrolyse von Cellulose wurde durch den faserigen Zerfall eines Filterpapierstreifens im Kulturröhrchen nachgewiesen.

Kulturmedium 5 g/L Pepton aus Casein; 5 g/L NaCl
der pH-Wert 7,2 wurde mit 2 mol/L Natronlauge eingestellt

Prüfung auf Veränderung von Lackmusmilch

Lackmusmilchmedium (Fertigmedium) wurde nach Vorschrift hergestellt (Autoklavierbedingungen: nur 5 min bei 121 °C!) und beimpft. Nach der Inkubation wurde das Medium auf die verschiedenen Reaktionstypen hin untersucht (Entfärbung durch Lackmusreaktion, Rosafärbung durch Säurebildung aus Lactose, Blaufärbung durch alkalische Reaktion durch NH_3 aus

Caseinabbau, Bildung eines weichen Klumpens durch Säurecaseinfällung, Bildung eines festen Klumpens durch enzymatische Caseingerinnung oder ein hochgedrückter Klumpen durch Gasbildung).

Prüfung auf Fixierung molekularen Stickstoffs

Durch Wachstum auf N-freiem Medium wurde die Fähigkeit, molekularen Stickstoff fixieren zu können, nachgewiesen. Um das Wachstum aufgrund endogener Stickstoffreserven ausschließen zu können, wurde das Wachstum auch in Subkultur überprüft.

N-freies Medium 0,14 g/L KH_2PO_4 , 1,07 g/L Na_2HPO_4 , 10 g/L DSM-SL-144, 2 g/L Glucose

B.7 Arbeiten mit *Escherichia coli*

B.7.1 Anzucht von Stämmen in LB-Medium

Zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen wurde LB-Medium (LURIA-BERTANI-Medium) in flüssiger und fester Form verwendet (SAMBROOK *et al.*, 1989). Nach dem Autoklavieren wurde dem Grundmedium Antibiotikum aus einer sterilfiltrierten Stammlösung ($c=50$ g/L) zugesetzt, um einen Selektionsdruck auszuüben und den Verlust der Plasmide zu unterbinden. Die Medien wurden mit einzelstehenden Kolonien angeimpft und bei 37 °C aerob in Kulturkolben ohne Schikanen inkubiert.

LB-Medium 10 g/L Bactotrypton (Best.-Nr. 0123, Fa. Difco, Hamburg), 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefeextrakt
der pH-Wert 7,0 wurde mit 5 mol/L Natronlauge eingestellt
für feste Medien zusätzlich 15 g/L Agar Agar

Antibiotika-Zusatz 60 mg/L Ampicillin

B.7.2 Einfluss verschiedener Mediumszusätze

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Mediumszusätze wurde ein Hefeextrakt-Basismedium mit unterschiedlichen Mengen an Glycerin, Glucose bzw. Nährsalzen verwendet. Jeweils 50 mL Medium wurden in 250-mL-Kulturkolben ohne Schikanen bei 37 °C aerob inkubiert.

Hefeextrakt-Basismedium 15 g/L Hefeextrakt (Ohly Deutsche Hefewerke GmbH & Co oHG, Hamburg)
10 g/L NaCl

Glucosemedium Basismedium mit 5 g/L Glucose

Glycerinmedium Basismedium mit 2,5 / 5 / 10 bzw. 30 g/L Glycerin

Nährsalzmedium Basismedium mit 5 g/L Glycerin
1,6 g/L NH_4Cl , 0,38 g/L KH_2PO_4 , 0,17 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Antibiotika-Zusatz 60 mg/L Ampicillin

pH-Wert der pH-Wert 7,0 wurde mit 5 mol/L Natronlauge eingestellt

B.7.3 Bestimmung der Zellzahl und der BTM von *E. coli*-Kulturen

Die Trübung einer Bakterienkultur wurde als optische Dichte OD_{605} mit einem Spektralphotometer (PM2A, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) bei einer Wellenlänge von 605 nm gegen Wasser gemessen. Der Zusammenhang zwischen Zellzahl Z (ausgezählt in einer THOMA-Zählkammer, Tiefe 0,02 mm, Fläche pro Großquadrat 0,0025 mm²) und Extinktion E wird durch die in Abbildung B.4 gegebene Gleichung beschrieben. Bei Bedarf wurden die Proben mit physiologischer Kochsalzlösung geeignet verdünnt.

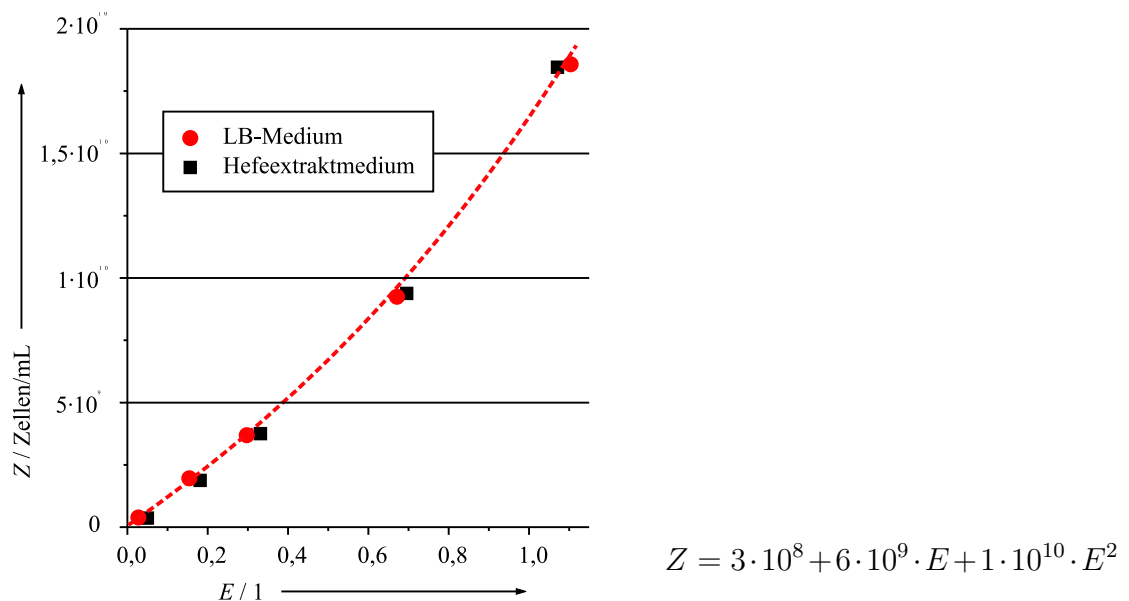


Abbildung B.4: Zusammenhang zwischen Zellzahl Z und Extinktion E , gemessen als OD_{605} ; für verschiedene Medienzusammensetzungen wurde der gleiche Zusammenhang beobachtet.

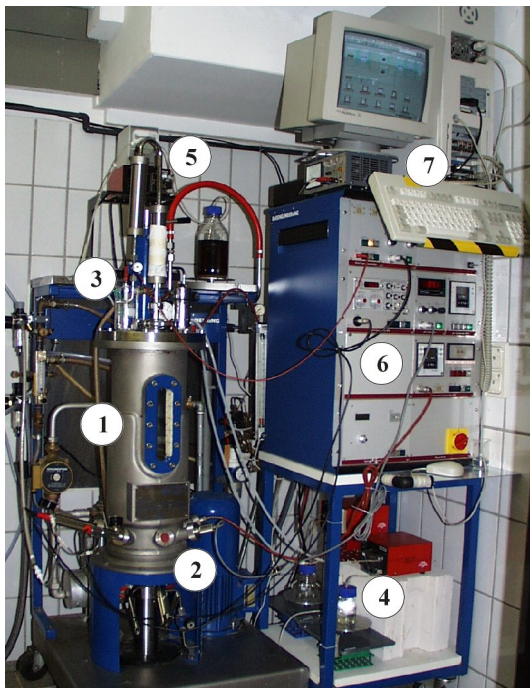
Für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurden 2,5 bis 10 mL Bakterienkultur unter Wasserstrahlvakuum durch einen gewogenen Rundfilter (Sartolon 0,45 μ m, Sartorius AG, Göttingen) abfiltriert und der Filter für 24 h bei 105 °C getrocknet, im Exsikkator über Trockengel abgekühlt und abschließend erneut gewogen. Der BTM-Gehalt ergab sich aus der errechneten Gewichts Differenz.

B.7.4 Fermentation von *E. coli*

Die Fermentationen wurden in einem Fermenter des Typs NLF22 (Bioengineering AG, Wald, Schweiz) mit folgender Ausstattung und Parametrierung durchgeführt:

- 10-L-Fermentationsansatz, zwei Blattrührer, $v=500$ Upm, Stechanschlüsse mit Silikonsepten für Medienzuführung, Probennahme mit Spritze und Kanüle (0,6 x 60 mm) über einen septumverschlossenen Sondenport im Fußbereich des Fermenters

- pO₂-Sonde (ID Nr. 30380, Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz) mit Regler und Anschluss an Hausdruckluft bzw. Sauerstoffdruckflasche; Sollwert 35 % Sättigung
- pH-Elektrode (Einstabmesskette Typ 465, Mettler-Toledo GmbH) mit PID-Regler (pH-Wert 7,0; P-Band 0,25; T_{on}=2,5 s; T_{off}=10 s) und Peristaltikpumpen (101U, Watson-Marlow Bredel, Cheltenham, Großbritannien) für Lauge- und Säuredosage
- Pt-100-Tempersensor, T=37 °C
- Redox-Elektrode (ID Nr. 20352, Mettler-Toledo GmbH)
- Schaumsensor mit Alarmklingel, manuelle Zugabe von Antischaummittel über Kanüle und Einwegspritze
- Medienzuführung über Peristaltikpumpe (Reglo digital MS/CA2-8, Ismatec SA, Glattbrugg-Zürich, Schweiz)
- kontinuierliche Gewichtsbestimmung der Vorlagegefäße (Wägemodule KT2000K-50N2405N-D, megaTron GmbH, Putzbrunn)
- Datenaufnahme und -visualisierung über die Software DasyLab 3.5 (DATALOG Systeme zur Messwerterfassung GmbH & Co. KG, Mönchengladbach)



- ① Fermenterraum mit Sichtkontrollfenster
- ② Messsonden und Probenahmeseptum
- ③ Anschlüsse für Zu-, Abluft, Medien
- ④ Lauge-, Säurepumpen
- ⑤ Medienpumpe und Vorlage
- ⑥ Steuerungseinheit
- ⑦ Protokollrechner mit DasyLab 3.5

Abbildung B.5: Foto des Fermenters NLF22 einschließlich Steuerungseinheit.

Die Bedienung des Fermenters erfolgte gemäß der Herstelleranleitung. Angeimpft wurde mit 2,5 % einer 15-h-Schüttelkolbenkultur. Während des Fermentationsverlaufes wurden regelmäßig

Proben genommen und die Zellzahl und der Gehalt an Glycerin und Acetat (siehe Abschnitt B.3.4, Seite 107) bestimmt. Von ausgesuchten Proben wurden außerdem entsprechend Abschnitt B.4.3 auf Seite 110 die Inulase-Aktivität (intrazelluläre und durch Zellyse im Überstand befindliche) und der Gehalt an Biotrockenmasse bestimmt. Die Umsetzung von Glycerin als hauptsächlicher Kohlenstoffquelle wurde anhand der Entwicklung des Sauerstoffsignales abgeschätzt und nach Bedarf Zugabemedium stoßweise zudosiert.

Lauge	5 mol/L Natronlauge
Säure	25 % Salzsäure
Antischaummittel	Struktol J673 (Schill & Seilacher Struktol AG, Hamburg)
Startmedium	15 g/L techn. Hefeextrakt (Ohly Deutsche Hefewerke GmbH & Co oHG, Hamburg) 2,5 g/L Glycerin, 10 g/L NaCl 60 mg/L Ampicillin nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugesetzt
Zugabemedium	100 g/L techn. Hefeextrakt (Ohly Deutsche Hefewerke GmbH & Co oHG) 55 g/L Glycerin

B.7.5 Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator

Anstelle der in Abschnitt B.4.3 beschriebenen Ultraschallmethode, die nur für kleine Testvolumina geeignet war, wurde für den Aufschluss der gesamten Fermentationsbrühe ein Hochdruckhomogenisator des Typs LAB60 (APV Gaulin GmbH, Lübeck) verwendet. Die aufzuschließende Zellbrühe wurde in drei Passagen mit 65 MPa und einem Durchsatz von 0,5 L/min bearbeitet, die Eintrittstemperatur betrug 5 °C, die Austrittstemperatur lag bei 21 °C.

B.8 Charakterisierung des Enzymes Inulase II

B.8.1 Aufkonzentrierung im Rotationsverdampfer

Zur Aufkonzentrierung wurden Lösungen in einem Rotationsverdampfer bei 110 Upm (Rotavapor RE 121, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) und einem Druck von 70 mbar (Membranvakuumpumpe CVC 2, Vacuubrand GmbH & Co KG, Wertheim) auf 55 °C erwärmt (Wasserbad 461, Fa. Büchi) und der Verlauf der Eindampfung durch regelmäßige Gewichtskontrolle verfolgt.

B.8.2 Dialyse von Proteinlösungen

Eine Dialyseeinheit vom Typ Slide-A-Lyzer (Best.-Nr. 66410, Cut-Off 10.000 Da, $V=3-5$ mL, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois) wurde für 30 sec im Dialysepuffer hydratisiert und dann die Proteinlösung mit einer Kanüle nach Anleitung eingefüllt. Die Dialyse erfolgte über Nacht unter leichtem Rühren bei 4 °C in 2 L Dialysepuffer.

Dialysepuffer 20 mmol/L Tris-HCl, pH-Wert 5,5 eingestellt mit Salzsäure ($c=25\%$)

B.8.3 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Vor der Verwendung wurde das Ammoniumsulfat fein gemörst und im Exsikkator getrocknet. Entsprechend der Tabelle von (KAPLAN, 1955), die in Abschnitt C.1 auf Seite 124 wiedergegeben ist, wurden nacheinander Sättigungen von 25, 40, 60, 80 und 100 % eingestellt. Die Zugabe des Ammoniumsulfates erfolgte langsam unter starkem Rühren, um lokale Überkonzentrationen zu verhindern. Nach der Zugabe wurde die Lösung jeweils weitere 15 min auf Eis gerührt, dann die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation ($15.000\times g$, 4°C , 15 min) abgetrennt und anschließend in Aufnahmepuffer resuspendiert.

Aufnahmepuffer 50 mmol/L Tris-HCl, pH-Wert 6,5 eingestellt mit Salzsäure ($c=25\%$)

B.8.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit Probenpuffer vermischt, für 3 min aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren, und dann jeweils 15-20 μL in die Taschen eines 12 %igen Polyacrylamidgels (Fertiggel, Best.-Nr. 161-1102, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien) geladen. Als Standard wurde ein „low-range“-Marker (Best.-Nr. M-3913, Sigma-Chemicals, St. Louis, Missouri) verwendet, der aus acht Proteinen von 6.500 Da bis 66 kDa besteht. Das Gel lief für 40 min bei 200 V in einem Mini-PROTEAN-II-System (Bio-Rad Laboratories Inc.), wurde dann für 15 min unter leichtem Schwenken im Färbebad koloriert und anschließend über Nacht entfärbt. Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte mit einer Digitalkamera (Camedia 1400L, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan).

SDS-Lösung	100 g/L SDS
Laufpuffer (10x)	144 g/L Tris, 30 g/L Glycin, 100 mL/L SDS-Lösung
Probenpuffer	2,9 mL H ₂ O, 1,6 mL 0,5 mol/L Tris-HCl pH 6,8, 2 mL Glycerin, 1,6 mL SDS-Lösung 0,4 mL Mercaptoethanol, 0,1 mL 1 % Bromphenolblau-Lösung
Färbebad	0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 400 mL Methanol, 500 mL H ₂ O
Entfärbebad	400 mL Methanol, 100 mL Eisessig, 500 mL H ₂ O

B.8.5 Isoelektrische Fokussierung von Proteinen

Das IEF-Fertig-Gel (Best.-Nr. 161-1010, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien) wurde in eine Mini-PROTEAN-II-Kammer (Bio-Rad Laboratories Inc.) eingesetzt, die obere Kammer mit 150 mL Kathodenpuffer und die untere mit 200 mL Anodenpuffer gefüllt. Dann wurden je 20 μL der zu gleichen Teilen mit Probenpuffer verdünnten Proben in die Taschen gegeben. Als Standard wurde ein IEF-Mix-Marker (Best.-Nr. I-3018, Sigma-Chemicals, St. Louis,

Missouri) verwendet. Die Laufprozedur bestand aus einer dreiteiligen Sequenz konstanter Spannungen:

100 V für 60 min 250 V für 60 min 500 V für 30 min

Nach dem Lauf wurde das Gel für 45 min im Färbebad koloriert und anschließend über Nacht entfärbt. Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte mit einer Digitalkamera (Camedia 1400L, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan).

Kathodenpuffer	14,5 g/L Lysin, 17,42 g/L Arginin
Anodenpuffer	42 mL/L Phosphorsäure
Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerin
Färbebad	270 mL Isopropanol, 100 mL Eisessig 0,4 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,5 g Crocein Scarlet, 500 mL H ₂ O
Entfärbebad	400 mL Methanol, 100 mL Eisessig, 500 mL H ₂ O

B.8.6 Blotting von Proteinen

Die Proteinlösung wurde entsprechend Abschnitt B.8.4 elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden jedoch nicht angefärbt, sondern mittels einer Fastblot-Apparatur (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) auf eine PVDF-Membran (Best.-Nr. 162-0186, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien) übertragen („blotten“).

Vor dem Blotten wurde die Membran für 10 s in reinem Methanol äquilibriert und dann für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Aus Whatman 3MM Filterpapier, den mit Transferpuffer getränkten Schwämmen des Apparates, dem Gel und der Membran wurde entsprechend der Herstelleranleitung ein Transferstapel aufgebaut. Das Blotting erfolgte für 2 h bei 10 V bzw. 45 mA. Die auf die Membran übertragenen Proteine wurde abschließend wie in Abschnitt B.8.5 beschrieben angefärbt und die Membran getrocknet.

Transferpuffer 3,03 g/L Tris, 14,2 g/L Glycin, 200 mL/L Methanol

B.8.7 Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante

Zur Bestimmung des K_M -Wertes wurde die Aktivität des Enzymes bei gleichbleibender Enzymkonzentration in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemessen. Die Inulinkonzentration wurde von 5 bis 150 g/L bezogen auf den Gesamtansatz mit zugesetzter Enzymlösung variiert. Die Enzymlösung wurde zuvor entsprechend der Abschnitte B.8.1, B.8.3 und B.8.2 durch Einrotieren aufkonzentriert, dialysiert, fraktioniert gefällt (80 % Fraktion) und erneut dialysiert.

Aus der Auftragung der gemessenen Aktivitäten gegen die Inulinkonzentration ergibt sich eine Substratsättigungskurve, aus der über nichtlineare Regression mithilfe des Programmes **Origin 6.0** (Microcal Software Inc., Northampton, Massachusetts) die Parameter der MICHAELIS-

MENTEN-Gleichung berechnet werden können. Die der Einfachheit halber verwendete Gleichung in der Form

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

mit der Reaktionsgeschwindigkeit v , der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} , der Inulinkonzentration $[S]$ und der Konzentration für halbmaximale Geschwindigkeit K_M geht hierbei davon aus, dass weder Substratüberschuss- noch Produktinhibierung vorliegen.

B.9 Immobilisierung der Inulase II

B.9.1 Quervernetzung mit Glutardialdehyd

Die Quervernetzung von Enzymen erfolgte durch Reaktion mit Glutardialdehyd und Chitosan. Das Chitosan (Chitosan niedermolekular, Best.-Nr. 22741, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz, im folgenden „Fluka-Chitosan“, bzw. „fine grade“ Produkt, Batch-No. TM578, Primex Ingredients ASA, Avaldsnes, Norwegen, im folgenden „Primex-Chitosan“) wurde in 0,5 % (w/w) Essigsäure gelöst und anschließend unter starkem Rühren durch langsame Zugabe von 1 mol/L Natronlauge der pH-Wert auf 5,5 eingestellt.

Die Chitosanlösung wurde zu gleichen Teilen mit abzentrifugierter Enzymlösung (15.000 \times g, 20 °C, 20 min) vermischt und anschließend unter ständigem Rühren Glutardialdehyd als 50 %ige Lösung zugesetzt und weitergerührt. Im Anschluss an die Reaktion wurden die gebildeten Flocken für 30 sec homogenisiert (ESGE M133/2280, 140 W, ESGE AG, Mettlen, Schweiz). Die Versuchsansätze wurden im 10- bzw. 20-mL-Maßstab in kleinen Bechergläsern, die auf einer Multirührplatte (Variomag, H+P Labortechnik GmbH, München) mit Magnetkernen gerührt wurden, durchgeführt.

Bei den Versuchen wurden die Parameter Chitosan- und Glutardialdehydkonzentration, Reaktionszeit und -temperatur zur Optimierung variiert. Die jeweils angewendeten Parameter sind im Ergebnisteil direkt bei den einzelnen Versuchen aufgeführt.

Zur Bestimmung der Aktivitäten wurde jeweils 1 mL des quervernetzten Ansatzes abzentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, 20.800 \times g, 5 min, 20 °C) und das Präzipitat in 1 mL physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Abhängig von der Fragestellung wurde das Präzipitat ggf. noch mehrfach gewaschen. Das resuspendierte Präzipitat und der Überstand wurden entsprechend Abschnitt B.4.1 untersucht.

Alternativ zu dem Zentrifugationsschritt wurde zur Analyse des vernetzten Produktes ein Einschluss in Alginat vorgenommen. Hierzu wurde die gesamte homogenisierte Lösung mit 2 % (w/w) Alginat (Protanal LF20/60, FMC Biopolymer AS, Haugesund, Norwegen) versetzt und aus 20 cm Höhe in die Trombe einer gerührten 2 % (w/w) Calciumchloridlösung getropft (Kanüle

0,9 x 40 mm). Nach einer Vernetzungszeit von 15 min wurden die gebildeten Perlen abgesiebt und mit Leitungswasser gewaschen.

Zur Bestimmung der eingeschlossenen Aktivität wurden Aliquots gewogen und entsprechend Abschnitt B.4.4 in Ansätzen von 1 mL wieder aufgelöst, um eine Unterbestimmung durch Diffusionseinflüsse zu vermeiden. Die Aktivität der resultierenden Lösung wurde bestimmt.

B.9.2 Einschluss in Curdlan-Gele

In der zu gelierenden Lösung (quervernetzte und homogenisierte Inulase) wurden 7 % (w/w) Curdlan (Pureglucan®/Curdlan N, Lot HM18A, Takeda Europe GmbH, Hamburg) dispergiert und für 5 min unter ständigem Rühren gequollen. Anschließend wurde die Suspension aus 25 cm Höhe mit einer 10 mL Spritze ohne Kanüle in ein stark gerührtes und auf 60 °C erhitztes Ölbad (Bröllo Sonnenblumenöl, Aldi GmbH & Co. KG, Essen) getropft. Nach 10 min wurden die Partikel abgesiebt und unter fließendem Wasser anhaftende Ölreste weitgehend entfernt.

B.9.3 Einschluss in Polyvinylalkohol

In der Mikrowelle wurden 80 mL LentiKat®Liquid (geniaLab GmbH, Braunschweig) aufgeschmolzen und nach dem Abkühlen bei 30 °C 20 mL der zu immobilisierenden Suspension (quervernetzte und homogenisierte Inulase) gut untergemischt. Mit einem LentiKat®Printer (geniaLab GmbH) wurden von dieser Lösung pro Arbeitsschritt ca. 400 identische Tröpfchen auf eine große Petrischale (Artikel-Nr. 639102, Greiner Labortechnik GmbH, Nürtingen) übertragen und dort durch Teiltrocknung auf 25 % der Ausgangsmasse innerhalb von ca. 20 min geliert. Anschließend wurde die Petrischale mit Stabilizerlösung (geniaLab GmbH) überschichtet und die Hydrogele für 1 h hierin nachgehärtet. Die LentiKats® hatten eine einseitig abgeflachte Linsenform und waren bei einem Durchmesser von 4 mm in der Mitte ca. 300 µm dick.

B.9.4 Einschluss in Alginat

Die quervernetzte und homogenisierte Enzymlösung wurde mit 2,5 % (w/w) Alginat (Protanal LF20/60, FMC Biopolymer AS, Haugesund, Norwegen) versetzt und durch ein 200-µm-Sieb passiert, um grobe Partikel abzutrennen. Anschließend wurden mithilfe eines JetCutters (geniaLab GmbH, Braunschweig, Düsendurchmesser 300 µm, Fluidstrom 0,9 g/sec, Speichenrad-schneider mit 48 Drähten à 100 µm Durchmesser, Rotationsgeschwindigkeit 7.000 Upm) Tröpfchen gebildet, die in einer 2 % (w/w) Calciumchloridlösung vernetzt wurden. Nach 20 min Aushärtung wurden die Perlen unter fließendem Leitungswasser in einem Turm mit Sieben der Maschenweite 500, 600, 710, 800 und 900 µm klassiert.

Anhang C

Hilfsmittel, Listen und Verzeichnisse

C.1 Herstellung von Ammoniumsulfatlösungen

$c_{\text{Start}} / \%$	$c_{\text{Ende}} / \% \text{ Sättigung}$																		
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	<u>65</u>	70	75	80	90	100		
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767		
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694		
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619		
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583		
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546		
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522		
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506		
<u>40</u>								31	63	97	132	<u>168</u>	205	245	285	375	469		
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431		
50										33	66	101	137	176	214	302	392		
55											33	67	103	141	179	264	353		
60												34	69	105	143	227	314		
65													34	70	107	190	275		
70														35	72	153	237		
75															36	115	198		
80																	77	157	
90																			79

Die Tabelle gibt an, welche zusätzliche Menge an Ammoniumsulfat zu einer bestehenden Ammoniumsulfatlösung bekannter Konzentration gegeben werden muss, um eine gewünschte neue Konzentration einzustellen. Als Beispiel ist die Kombination aus der Anfangskonzentration von 40 % und der Zielkonzentration von 65 % unterstrichen dargestellt: Für einen Liter der Ausgangslösung sind 168 g Ammoniumsulfat erforderlich ([KAPLAN, 1955](#)).

C.2 Berechnung des Katalysatorausschüttungsgrades

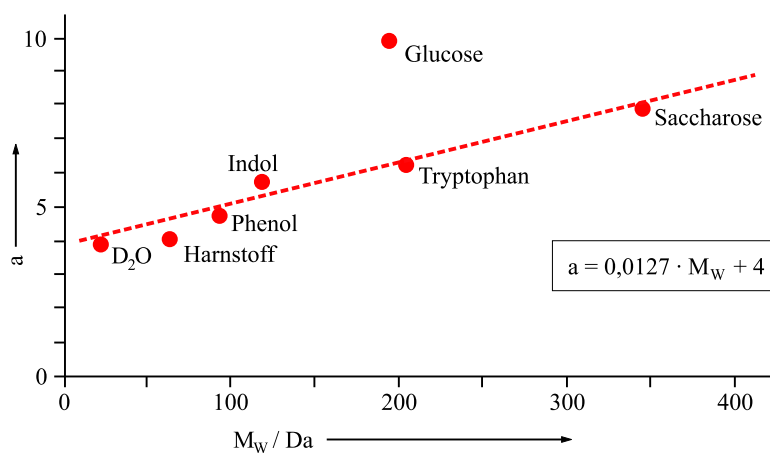


Abbildung C.1: Abschätzung des Molekulargewichtsparameters a nach (VORLOP, 1984).

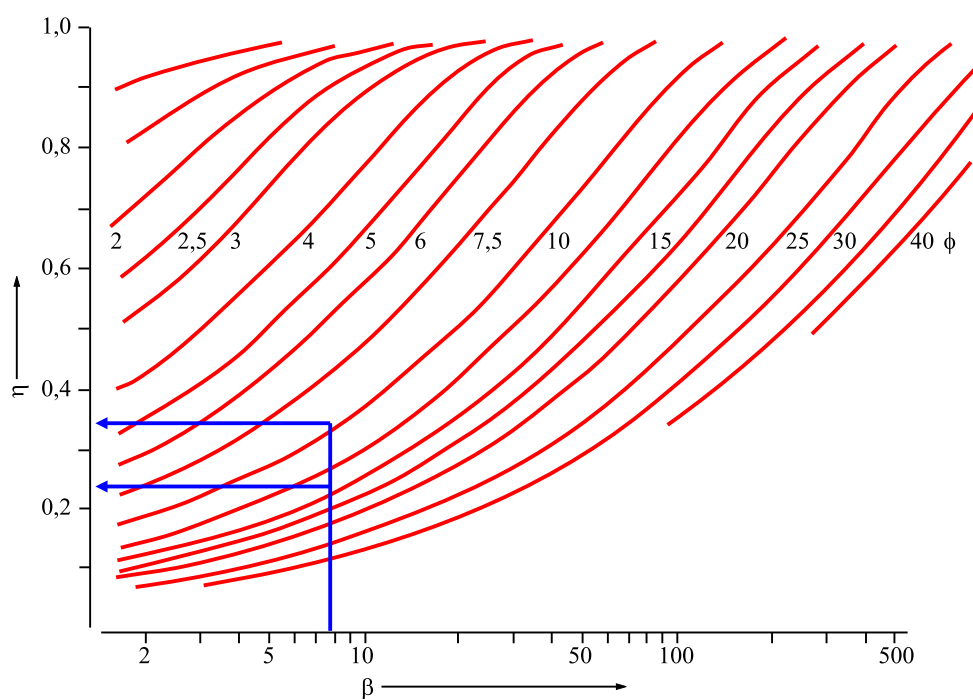


Abbildung C.2: Abschätzung des Katalysatorausschüttungsgrades η anhand von β und Φ (VORLOP, 1984).

C.3 Abkürzungsverzeichnis

A_{abs}	absolute Aktivität in einem beliebigen Volumen
A_v	volumetrische Aktivität
APG	Alkylpolyglykosid
ATCC	American Type Culture Collection
BTM	Biotrockenmasse in g/L
c	Konzentration
CF6/7/8	α -/β-/γ-Cyclofructan
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
D_{eff}	effektiver Diffusionskoeffizient
DFA	Difuctoseanhydrid
DP	degree of polymerisation, Polymerisationsgrad
F	Fructose
FDA	US Food and Drug Administration
FOS	Fructooligosaccharide
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Glucose
GA	Glutardialdehyd
GF	Saccharose
GF ₂	Kestose
GF ₃	Nystose
GF ₄	Fructosylnystose
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ift	Gen für Inulase II, Inulinfructotransferase
K_M	Wert der MICHAELIS-MENTEN-Konstante
L	Liter
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
min	Minute
PVA	Polyvinylalkohol
SDS	Natriumdodecylsulfat
U	Unit, 1 U = 1 μmol/min
Upm	Umdrehungen pro Minute
%(w/w)	Gewichtsprozent

C.4 Internetadressen der aufgeführten Firmen

www.advantech.com	Advantech Co. Ltd., Shin Tien City, Taiwan
www.aldi.de	Aldi GmbH & Co. KG, Essen
www.bamix.com	ESGE AG, Mettlen, Schweiz
www.bandelin.com	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
www.biorad.com	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien
www.buchi.ch	Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz
www.cavro.com	Cavro Scientific Instruments Inc., Sunnyvale, Kalifornien
www.cosucra.com	Cosucra S. A., Fontenoy, Belgien
www.dasylab.de	DATALOG Systeme zur Messwerterfassung GmbH & Co. KG
www.dbs.de	DBS GmbH, Bremen
www.diversa.com	Diversa Corp., San Diego, Kalifornien
www.evotec.de	EVOTEC BioSystems AG, Hamburg
www.fedegari.com	Fedegari Autoclavi SPA, Albuzzano, Italien
www.fmcbiopolymer.com	FMC Biopolymer AS, Haugesund, Norwegen
www.genialab.de	geniaLab GmbH, Braunschweig
www.greiner-lab.com	Greiner Labortechnik GmbH, Nürtingen
www.herc.com	Hercules, Kopenhagen, Dänemark
www.ika.de	IKA Werke GmbH & Co., Staufen
www.infors.ch	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
www.ismatec.com	Ismatec SA, Glattbrugg-Zürich, Schweiz
www.jvc.com	JVC Victor Company of Japan Ltd., Yokohama, Japan
www.kendro.de	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
www.laevosan.com	Laevosan GmbH, Linz, Österreich
www.maxon.ch	Maxon Motor GmbH, München
www.megatron.de	megaTron GmbH, Putzbrunn
www.millipore.com	Millipore Corp., Bedford, Massachusetts
www.mitsubishi.com	Mitsubishi Electric Corp., Tokyo, Japan
www.motorola.com	Motorola Inc., Rolling Meadows, Illinois
www.mt.com	Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz
www.ohly.de	Ohly Deutsche Hefewerke GmbH & Co oHG, Hamburg
www.olympus.com	Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan
www.omron.com	Omron Corp., Tokyo, Japan
www.perkinelmer.com	PerkinElmer Inc., Boston, Massachusetts
www.piercenet.com	Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois
www.primex.no	Primex Ingredients ASA, Avaldsnes, Norwegen
www.sartorius.de	Sartorius AG, Göttingen
www.sb.com	Smithkline Beecham PLC, Brentford, Großbritannien
www.sharp.co.jp	Sharp Corp., Japan
www.shimadzu.de	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
www.sigma-aldrich.com	Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri
www.soft imaging.de	Soft Imaging System GmbH, Münster
www.sommer-automatic.de	Sommer-automatic GmbH & Co. KG, Straubenhardt
www.spark-holland.nl	Spark Holland Instrumenten, Emmen, Niederlande

www.stratagene.com	Stratagene Corp., La Jolla, Kalifornien
www.struktol.de	Schill & Seilacher Struktol AG, Hamburg
www.suedzucker.de	Südzucker AG, Mannheim
www.systec-lab.de	Systec GmbH, Wettenberg
www.takeda.com	Takeda Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
www.tecan.com	TECAN Group AG, Hornbrechtikon, Schweiz
www.terrigen.com	TerraGen Discovery Ltd., Slough, Großbritannien
www.valco.com	Valco Instruments Inc., Houston, Texas
www.watson-marlow.com	Watson-Marlow Bredel, Cheltenham, Großbritannien
www.zeiss.de	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Literaturverzeichnis

- ABASAEED, A. E.; LEE, Y. Y. (1995). Inulin hydrolysis to fructose by a novel catalyst. *Chemical Engineering Technology*, **18**, 440–44.
- ALLSOP, A. E. (1998). New antibiotic discovery, novel screens, novel targets and impact of microbial genomics. *Current Opinions in Microbiology*, **1**(5), 530–534.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (1985). Estimation of bacterial density. *Seiten 923–927 in: Standard methods for the examination of water*. APHA.
- ARNOLD, F. H. (1996). Directed evolution: creating biocatalysts for the future. *Chemical Engineering Science*, **51**(23), 5091–5102.
- ASCHE, W. (1996). Vitamine, Pesticide und kombinatorische Chemie. *BioTec*, **3**, 30–34.
- BAERNS, M.; HOFFMANN, H.; RENKEN, A. (1992). *Lehrbuch der Technischen Chemie Band 1: Chemische Reaktionstechnik*. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- BAJPAI, P.; BAJPAI, P. K. (1989). Utilization of Jerusalem artichoke for fuel ethanol production using free and immobilized cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **11**, 155.
- BARON, M.; FLORENÇIO, J. A.; ZANIN, G. M.; FERREIRA, A. G.; ENNES, R.; FONTANA, J. D. (1996). Difuctose anhydride-forming bacterial inulinase II and fructogenic fungal inulase I. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **57/58**, 605–615.
- BATEMAN, R.; JARVIS, S.; GILES, K.; ORGAN, A.; DE BIASI, V.; HASKINS, N. (2000). Multiple LC/MS: parallel and simultaneous analyses of liquid streams by LC/TOF mass spectrometry in high throughput environments. *Seiten 114–115 in: Book of Abstracts, 1st International Symposium on Synthesis, Screening and Sequencing (ACHEMA2000, Frankfurt)*.
- BG CHEMIE. (1998). *Sichere Biotechnologie. Eingruppierung biologischer Agenzien: Bakterien*. Merkblatt B 006, 8/98, ZH 1/346. Heidelberg: Jedermann-Verlag Dr. Otto Pfeffer oHG.
- BOGAERT, P. M. P.; SLAGHEK, T. M. (1997). Inulin-based products effective in heavy metal removal. *In: Proceedings of the 4th International Workshop on Carbohydrates as Organic Raw Materials (Wien)*.
- BORREBAECK, C. A. (2000). Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. *Immunology Today*, **21**(8), 379–382.

- BRECHT, A.; ROTHMUND, M.; SCHÜTZ, A.; SCHOBEL, U.; GAUGLITZ, G. (1998). Optische Methoden im High-Throughput-Screening zur Wirkstoffsuche. *BioTec*, **3**, 26–28.
- BUCHHOLZ, K. (2000). *Non-Food-Produkte aus Inulin, TV2: Chemische Derivatisierung und Immobilisierung*. Gemeinsamer Abschlussbericht der Projektbeteiligten. Projektträger: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (Gülzow).
- BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V. (1997). *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft.
- CAESAR, C.J. (56 BC). *De Bello Gallico*.
- CAVRO (1996). Handbuch „RSP9000 Series, Operator’s Manual“ der Fa. Cavro Scientific Instruments, Sunnyvale, Kalifornien.
- CHAPLIN, M. (2001). Internet-Lehrbuch der South Bank University, Großbritannien, <http://www.sbu.ac.uk/biology/enztech/diffusion.html>.
- CHARMAN, M.; SARROUKH, A. M. (2000). Microdroplets: high throughput fermentation and screening system. *Seiten 561–562 in: Abstracts of the World Congress on Biotechnology (Berlin)*.
- CHU, Y-D. (1988). *The formation of difructose dianhydrides and their impact on fructose crystallization*. Dissertation, Michigan State University.
- COSUN (2000). Firmeninformation Cosun Industrial Inulin Derivates (Roosendaal, Niederlande), <http://www.nva.net/bedrijven/cosun>.
- CUTAYAR, J. M.; POILLON, D. (1989). High cell density culture of *E. coli* in a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator. *Biotechnology Letters*, **11**, 155–160.
- DAMKÖHLER, G. (1937). Influence of diffusion, fluid flow, and heat transport on the yield in chemical reactors. *Der Chemie Ingenieur*, **3**, 359–485.
- DE GOEDE, A. T. J. W.; VAN RANTWIJK, F.; VAN BEKKUM, H. (1991). On the synthesis of alkyl fructosides. *Seiten 18–21 in: FUCHS, A. (Editor), Abstracts of the International Congress on Food and Non-Food Applications of Inulin and Inulin-Containing Crops (Wageningen)*.
- DEFAYE, J.; GADELLE, A.; PEDERSEN, C. (1985). The behaviour of D-fructose and inulin towards anhydrous hydrogen fluids. *Carbohydrate Research*, **136**, 53.
- DIVERSA CORPORATION (2000). Internet-Darstellung, <http://www.diversa.com>.
- DOMEYER, M.; VOLLERT, H.; ZUNDEL, C.; THÜRK, M. (2000). Discovery of implicit knowledge in screening data using artificial intelligence. *Seiten 116–119 in: Book of Abstracts, 1st International Symposium on Synthesis, Screening and Sequencing (ACHEMA2000, Frankfurt)*.

- EDELMAN, J.; JEFFORD, T. G. (1968). The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist*, **67**, 517–531.
- EIGNER, W. D.; ABUJA, P.; BECK, R. H. F.; PRAZNIK, W. (1988). Physicochemical characterization of inulin and sinistrin. *Carbohydrate Research*, **180**, 87.
- FAGES, J.; MULARD, D.; ROUQUET, J. J.; WILHELM, J. L. (1986). 2,3-Butanediol production from Jerusalem artichoke, *Helianthus tuberosus*, by *Bacillus polymyxa* ATCC 12321. Optimization of $k_L a$ profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **25**, 197.
- FAVRE-BULLE, O.; JOSSES, P.; ARIAGNO, A.; GOULARD, A. (1998). Automated techniques in screening for microorganisms with biocatalytic properties. *Seiten 49–52 in*: KIESLICH, K.; VAN DER BEEK, C. P.; DE BONT, J. A. M.; VAN DEN TWEEL, W. J. J. (Editoren), *New frontiers in screening for microbial biocatalysts*. Amsterdam: Elsevier.
- FREESE, L. (1993). Production and utilization of inulin part I. *Seiten 303–317 in*: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N. J. (Editoren), *Science and Technology of Fructans*. Boca Raton: CRC Press.
- FRENCH, A. D.; WATERHOUSE, A. L. (1993). Chemical structure and characteristics. *Seiten 41–81 in*: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N. J. (Editoren), *Science and Technology of Fructans*. Boca Raton: CRC Press.
- FUCHS, A. (1987). Potentials for non-food utilization of fructose and inulin. *Starch/Stärke*, **39**, 335.
- FUCHS, A. (1991). Current and potential food and non-food applications of fructans. *Biochemical Society Transactions*, **19**, 555–560.
- GARNIER, J.; OSGUTHORPE, D. J.; ROBSON, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, **120**, 97–120.
- GUPTA, A. K.; BHATIA, I. S. (1982). Glucofructosan biosynthesis in *Fusarium oxysporum* – regulation and substrate specificity of fructosyl transferase and invertase. *Phytochemistry*, **21**, 1249–1253.
- HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E.; JANG, K. Y. (1995). Enzymatic conversion of sucrose to kestose by fungal extracellular fructosyltransferase. *Biotechnology Letters*, **17**(3), 295–298.
- HARADA, T. (1977). Production, properties, and application of curdlan. *Seiten 265–283 in*: SANDFORD, P. A.; LASKIN, A. (Editoren), *Extracellular microbial polysaccharides*. ACS Symposium Series, Vol. 45.
- HARAGUCHI, K.; KISHIMOTO, M.; SEKI, K.; HAYASHI, K.; KOBAYASHI, W.; KAINUMA, K. (1988). Purification and properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter globiformis* C11-1. *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**(1), 291–292.

- HARAGUCHI, K.; SEKI, K.; KISHIMOTO, M.; NAGATA, T.; KASUMI, T.; KAINUMA, K.; KOBAYASHI, S. (1995). Cloning and nucleotide sequence of the inulin fructransferase (DFA I-producing) gene of *Arthrobacter globiformis* S14-3. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **59**(10), 1809–1812.
- HARTMEIER, W. (1986). *Immobilisierte Biokatalysatoren*. Berlin: Springer Verlag.
- HELLWEGE, E. M.; GRITSCHER, D.; WILLMITZER, L.; HEYER, A. G. (1997). Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs. *Plant Journal*, **12**, 1057–1065.
- HENCO, K. (2000). EVOTEC BioSystems AG. *Seiten 39–45 in: Book of Abstracts, 1st International Symposium on Synthesis, Screening and Sequencing (ACHEMA2000, Frankfurt)*.
- HENDRY, G. A. F.; WALLACE, R. K. (1993). The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. *Seiten 119–139 in: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N. J. (Editoren), Science and Technology of Fructans*. Boca Raton: CRC Press.
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. (1988). A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**, 1181–1187.
- HOLT, J. G. (Editor). (1993). *Bergey's manual of determinative Bacteriology*. 9. Auflage. Philadelphia, Pennsylvania: Williams & Wilkins.
- JAEGER, K.-E.; LIEBETON, K.; ZONTA, A.; REETZ, M. T. (1999). Design neuer Lipasen für die Biotechnologie. *Seiten 96–98 in: Proceedings des 2. Workshops Biokonversion nachwachsender Rohstoffe (Braunschweig)*.
- JEKEL, M.; BUHR, A.; WILLKE, T.; VORLOP, K.-D. (1998a). Immobilization of biocatalysts in LentiKats. *Chemical Engineering & Technology*, **21**(3), 275–278.
- JEKEL, M.; BUHR, A.; WIEGAND, M.; BLÜMEL, M.; BREFORD, J.; WILLKE, T.; VORLOP, K.-D. (1998b). Zell-Einschlußimmobilisierung in LentiKats® (Poster). *Seite 168 in: Abstracts der DECHEMA Jahrestagung Biotechnologie, Band I (Wiesbaden)*.
- JENSEN, K.; WIRTH, N. (1974). *PASCAL - User Manual and Report. ISO Pascal Standard*. Berlin: Springer Verlag.
- JUNG, K. H.; LIM, J. Y.; YOO, S. J.; LEE, J. H.; YOO, M. Y. (1987). Production of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, **9**, 703–708.
- KANG, S.-I.; KIM, S.-I. (1993). [Artikel nur in Koreanisch veröffentlicht]. *Journal of the Korean Agricultural and Chemistry Society*, **21**, 36–40.
- KANG, S.-I.; KIM, W.-P.; CHANG, Y.-K.; KIM, S.-I. (1998). Purification and properties of inulin fructotransferase (DFA-III-producing) from *Bacillus* sp. snu-7. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **62**(4), 628–631.
- KANKE, M.; TANABE, E.; KATAYAMA, H.; KODA, Y.; YOSHITOMI, H. (1995). Application of curdlan to controlled drug delivery. III. Drug release from sustained release suppositories in Vitro. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **18**(8), 1154–1158.

- KAPLAN, N. (1955). *Methods in enzymology*. Band 1. New York: Academic Press.
- KAWAMURA, M.; UCHIYAMA, T. (1989). Formation of a cycloinulo-oligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ 31B. *Carbohydrate Research*, **192**, 83–90.
- KAWAMURA, M.; UCHIYAMA, T. (1993). Reactions catalysed by cycloinulo-oligosaccharide fructotransferase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **57**(2), 343.
- KAWAMURA, M.; TAKAHASHI, S.; UCHIYAMA, T. (1988). Purification and some properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter ilicis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**(12), 3209–3210.
- KIM, C. H.; RHEE, S. K. (1990). Ethanol production from Jerusalem artichoke by inulinase and *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **23**, 171.
- KIM, D. H.; CHOI, Y. J.; SONG, S. K.; YUN, J. W. (1997). Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters*, **19**(4), 369–371.
- KIM, G. E.; LEE, S. (2000). Efficient production of DFA III (di-D-fructofuranose-dianhydride) from chicory root. Seite 272 in: *Abstracts of the World Congress on Biotechnology (Berlin)*.
- KLEIN, J.; VORLOP, K.-D. (1985). Immobilization techniques: Cells. Seiten 203–224 in: MOO-YOUNG, M. (Editor), *Comprehensive Biotechnology Vol. 2*. Oxford: Pergamon Press.
- KLEIN, J.; VORLOP, K. D.; STEINERT, H.-J. (1984). *Biokatalysator und Verfahren zu seiner Herstellung*. Deutsche Patentanmeldung DE3432923.
- KRÖGER, M. (2000). *persönliche Mitteilung*. Dissertation in Vorbereitung, Institut für Technologie und Biosystemtechnik, FAL Braunschweig und Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- KUNZ, M.; HAJI BEGLI, A. (1993). *Verwendung von Inulinderivaten*. Deutsche Patentanmeldung DE4326782.
- KUNZ, M.; MUNI, M.; VOGEL, M. (1993). *Verfahren zur Herstellung von langkettigem Inulin*. Deutsche Patentanmeldung DE4316425.
- KURAMOTO, G. (1988). *unvollständige Literaturangabe*. lediglich erwähnt in Europäischer Patentanmeldung EP336376.
- KUSHIBE, S.; SASHIDA, R.; MORIMOTO, Y.; OHKISHI, H. (1993). Purification and characterization of a Di-D-fructofuranose 2',1;2,1'-dianhydride producing enzyme from *Streptomyces* sp. MCI-2524. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **57**(12), 2054–2058.
- KUSHIBE, S.; UEDA, M.; MORIMOTO, Y. (1996). Production of novel branched cyclofructans by *Bacillus subtilis* MCI-2834. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **60**(10), 1677–1680.
- KUSTER, B. F. M. (1990). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). A review focusing on its manufacture. *Starch/Stärke*, **42**, 314.

- LAMOTTE, S.; BISCHOFF, K. D. (2000). Fast HPLC separations as a tool for high sample throughput – what is the speed limit? *Seiten 89–90 in: Book of Abstracts, 1st International Symposium on Synthesis, Screening and Sequencing (ACHEMA2000, Frankfurt).*
- LEE, S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, **14**, 98–105.
- LEENHEER, L. (1996). Production and use of inulin: industrial reality with a promising future. *Seiten 67–92 in: VAN BEKKUM, H.; RÖPER, H.; VORAGEN, A. G. J. (Editoren), Carbohydrates as Organic Raw Material III. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft.*
- LOZINSKY, V. I.; PLIEVA, F. M. (1996). Cell entrapment within PVA-cryogel carriers: State of art and potentials. *Seiten 13–22 in: DAUTZENBERG, H.; PONCELET, D. (Editoren), Proceedings of the International Workshop BIOENCAPSULATION V (Potsdam).*
- MACMICHAEL, D. B.; DRAKE, D.; ARLINGTON, S. A.; NORMANSELL, I. D.; ADDICOTT, J. K.; DIVERS, M. S.; STOVOLD, J. S. (1994). *Novel process and apparatus*. PCT-Patentanmeldung WO 94/2819.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (1999). *Brock's Biology of Microorganisms*. New Jersey: Prentice Hall.
- MARX, S. P.; WINKLER, S.; KÖNIG, S.; HARTMEIER, W. (2000). Are inulins the only prebiotic fructose-oligosaccharides. *Seite 288 in: Abstracts of the World Congress on Biotechnology (Berlin).*
- MCDONALD, E. J. (1947). The polyfructosans and difructose anhydrides. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, **2**, 253.
- MELDRUM, D. (2000). Automation for genomics, part two: sequencers, microarrays, and future trends. *Genome Research*, **10**(9), 1288–1303.
- MOSBACH, K.; MOSBACH, R. (1966). Entrapment of enzymes and microorganisms in synthetic crosslinked polymers and their application in column technique. *Acta Chemica Scandinavica*, **20**(10), 2807–2810.
- MURAKAMI, H.; MUROI, H.; NAKANO, H.; KITAHATA, S. (1993). [Artikel nur in Japanisch veröffentlicht]. *Kagaku to Kogyo*, **67**, 365–370.
- NAKAMURA, T.; SHITARA, A.; MATSUDA, S.; MATSUO, T.; SUIKO, M.; OHTA, K. (1977). Production, purification and properties of an endoinulase from *Aspergillus niger* mutant 817. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **78**, 134–139.
- NASBY, N.; CANTAFIO, A.; ARONSON, N.; SHERMAN, D. (1997). Bioencapsulation for high-throughput screening. *In: Proceedings of the International Workshop on Bioencapsulation VI (Barcelona), talk 3.1.*
- NEUBAUER, A. (1998). *Erzeugung von Difructoseanhydrid III und Inulobiose aus Inulin mit *Arthrobacter ureafaciens* ATCC 21124*. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

- OIWA, H.; NAGANUMA, M.; OHNUMA, S. (1987). Acetone-butanol production from dahlia inulin by *Clostridium pasteurianum* var. I-53. *Agricultural and Biological Chemistry*, **51**, 2819.
- PABST, R. (2000). *persönliche Mitteilung*. Mitarbeiter der Fa. Georg Breuer GmbH (Kronberg).
- PARK, J. P.; BAE, J. T.; YOU, D. J.; KIM, B. W.; YUN, J. W. (1999). Production of inulooligosaccharides from inulin by a novel endoinulinase from *Xanthomonas* sp. *Biotechnology Letters*, **21**, 1043–1046.
- PARZICH, E. (1999). Forschungsk Kooperation: BASF und Fraunhofer-Institut entwickeln neue Testverfahren für Biokatalysatoren. *BioTec*, **2**, 12.
- PATIL, V. B.; PATIL, N. B. (1999). Purification and immobilization of fructosyl transferase for production of fructo-oligosaccharide(s) from sucrose. *Indian Journal of Experimental Biology*, **37**, 830–834.
- PERSIDIS, A. (1998). High-throughput screening. *Nature Biotechnology*, **16**, 488–489.
- PRÜSSE, U. (1999). *Entwicklung, Charakterisierung und Einsatz von Edelmetallkatalysatoren zur Nitratreduktion mit Wasserstoff und Ameisensäure sowie des Strahlschneiderverfahrens zur Herstellung Polyvinylalkohol-verkapselter Katalysatoren*. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- PSZCZOLA, D. E. (1997). Curdlan differs from other gelling agents. *Food Technology*, **51**(4), 30.
- PUDEL, V. (1996). Vom Genußwert des ungesunden Geschmacks. *Seiten 52–73 in: De gustibus (non?) est disputandum, 23. Südzucker Symposium*. Mannheim: Südzucker AG.
- RAAIJMAKERS, H. W. C.; PETERS, A. L. J.; MEYER, P. D.; KUZEE, H. C.; BOLKENBAAS, M. E. B. (1997). Physico-chemical modifications of inulin: Properties and applications. *In: Proceedings of the 4th International Workshop on Carbohydrates as Organic Raw Materials (Wien)*.
- RICHARDS, G. N. (1996). *Production of fructose dianhydride products from inulin*. US-Patentanmeldung US525190.
- RICHTER, K. (1999). Lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers. *Seiten 181–187 in: Proceedings of the 6th Symposium on Renewable Resources (Bonn)*.
- RIESENBERG, D.; SCHULZ, V.; KNORRE, W. A.; POHL, H.-D.; KORZ, D.; SANDERS, E. A.; ROSS, A.; DECKWER, W.-D. (1991). High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Journal of Biotechnology*, **20**, 17–27.
- ROH, H. J.; KIM, P.; PARK, Y. C.; CHOI, J. H. (2000). Bioconversion of D-tagatose by expression of L-arabinose isomerase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **31**(1), 1–4.
- RÖPER, H.; GOOSSENS, J. (1993). Erythritol, a new raw material for food and non-food applications. *Starch/Stärke*, **11**, 400–405.

- ROSENBERG, I. M. (1996). *Protein analysis and purification: Benchtop techniques*. Basel: Birkhäuser Verlag AG.
- RUTHERFORD, P. P.; DEACON, A. C. (1972). β -Fructofuranosidases from roots of dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). *Biochemistry Journal*, **126**, 569.
- SAITO, K.; TOMITA, F. (2000). Difructose anhydrides: their mass-production and physiological functions. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **64**(7), 1321–1327.
- SAITO, K.; GOTO, H.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. (1997). Purification of levan fructotransferase from *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 and production of DFA IV from levan by the enzyme. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **61**(10), 1705–1709.
- SAKURAI, H.; YOKOTA, A.; SUMITA, Y.; MORI, Y.; MATSUI, H.; TOMITA, F. (1997a). Metabolism of DFA III by *Arthrobacter* sp. H65-7: purification and properties of a DFA III hydrolysis enzyme (DFA IIIase). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **61**(6), 989–993.
- SAKURAI, H.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. (1997b). Molecular cloning of an inulin fructotransferase (depolymerizing) gene from *Arthrobacter* sp. H65-7 and its expression in *Escherichia coli*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **61**(1), 87–92.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SARA LEE (2000). Produktinformation der Sara Lee Corp. (Chicago, Illinois) über Natreen, <http://www.natreen.com>.
- SAWADA, M.; TANAKA, T.; TAKAI, Y.; HANAFUSA, T.; HIROTSU, K.; HIGUCHI, T.; KAWAMURA, M.; UCHIYAMA, T. (1990). Crystal structure of cycloinulohexaose. *Chemistry Letters*, 2011–2014.
- SCHUBERT, M. (1999). *persönliche Mitteilung*. Arbeiten zur Klonierung und Expression des *ift*-Genes aus *u0141* in *Escherichia coli*, Institut für Technologie und Biosystemtechnik der FAL (Braunschweig).
- SCHUBERT, M. (2000). *persönliche Mitteilung*. Arbeiten zur Optimierung der Inulase II aus *u0141*, Institut für Technologie und Biosystemtechnik der FAL (Braunschweig).
- SCHWILLE, P.; KORLACH, J.; WEBB, W. W. (1999). Fluorescence correlation spectroscopy with single molecule sensitivity on cell and model membranes. *Cytometry*, **36**, 176–182.
- SEKI, K.; HARAGUCHI, K.; KISHIMOTO, M.; KOBAYASHI, S.; KAINUMA, K. (1989). Purification and properties of a novel inulin fructotransferase (DFA I-producing) from *Arthrobacter globiformis* S14-3. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**(8), 2089–2094.
- SEVENIR, R.; HALL, R. D.; VAN DER MEER, I. M.; HAKKERT, H. J. C. (1998). High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. *Nature Biotechnology*, **16**, 843–46.
- SHIOMI, N. (1989). Properties fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in liliaceous plants. *Journal of Plant Physiology*, **134**, 151–156.

- SIGMA ALDRICH (2000). Produktkatalog der Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen), Biochemikalien und Reagenzien für die Life Science Forschung.
- SKERMAN, V.B.D. (1967). *A guide to the identification of the genera of bacteria – with methods and digests of generic characteristics*. 3. Auflage. Philadelphia, Pennsylvania: Williams & Wilkins.
- SMIDSROD, V.; SKJÅK-BRÆK, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, **8**, 71–78.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERRMANSON, G. T.; MALLA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEK, N. K.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchinonic acid. *Analytical Biochemistry*, **150**, 76–85.
- SPETTMANN, T. (2000). Ausführungen auf der Hauptversammlung der Südzucker AG Mannheim/Ochsenfurth am 24.08.2000 im Congress-Centrum in Würzburg.
- SPIEKERMANN, P.; VORLOP, K. D.; KLEIN, J. (1987). Animal cell encapsulated within Calcium alginate hollow-spheres. *Seiten 590–593 in: NEIJSEL, O. M.; VAN DER MEER, R. R.; LOYBEN, K. CH. A. M. (Editoren), Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology*, Band 3. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- STACKEBRANDT, E. (1998). The enormous diversity and biotechnological potential of naturally occurring bacteria. *Seiten 37–47 in: KIESLICH, K.; VAN DER BEEK, C. P.; DE BONT, J. A. M.; VAN DEN TWEEL, W. J. J. (Editoren), New frontiers in screening for microbial biocatalysts*. Amsterdam: Elsevier.
- STAHL, W. (1998). High Throughput Screening: Erfahrungen und Trends. *BioTec*, **2**, 34–35.
- STRATTON, J.; CHIRUVOLU, V.; MEAGHER, M. (1998). High-cell-density-fermentation. *Seiten 107–120 in: HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. (Editoren), Methods in Molecular Biology Vol 103: Pichia Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- SUZUKI, D. T.; GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. (1991). *Genetik*. Weinheim: VCH.
- SUZUKI, M. (1993). History of fructan research: Rose to Edelman. *Seiten 21–40 in: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N. J. (Editoren), Science and Technology of Fructans*. Boca Raton: CRC Press.
- SUZUKI, T.; HARA, H.; KASAI, T.; TOMITA, F. (1998). Effects of difructose anhydride III on calcium absorption in small and large intestines of rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **62**(5), 837–841.
- TAKAI, Y.; OKUMURA, Y.; TANAKA, T.; SAWADA, M.; TAKAHASHI, S.; SHIRO, M.; KAWAMURA, M.; UCHIYAMA, T. (1994). Binding characteristics of a new host family of cyclic oligosaccharides from inulin: permethylated cycloinulohexaose and cycloinulohexaose. *Journal of Organic Chemistry*, **59**, 2967–2975.
- TAKEDA EUROPE (1999). *Pureglucan® – basic properties and food applications*. Produktinformationen der Fa. Takeda Europe GmbH (Hamburg).

- TANAKA, T.; UCHIYAMA, T.; KOBORI, H.; TANAKA, K. (1975). Enzymic hydrolysis of di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride with *Arthrobacter ureafaciens*. *Journal of Biochemistry*, **8**, 1201–1206.
- THIELE, E. W. (1939). Relations between catalytic activity and size of particle. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, **31**, 916–920.
- THIERICKE, R.; SCHMID, I.; GROPP, T.; EBERT, G. (2000). Automation for Ultrahigh Throughput Screens. *Genetic Engineering News*, **20**(14), 32.
- TIRLEMONTTOISE (1990). Technisches Datenblatt der Raffinerie Tirlemontoise S. A. (Tienen, Belgien) über Raftiline.
- TREYBAL, R. E. (1980). *Mass transfer operations*. 3. Auflage. New York: McGraw-Hill.
- UCHIYAMA, T. (1975a). Action of *Arthrobacter ureafaciens* inulase II on several oligofructans and bacterial levans. *Biochimica et Biophysica Acta*, **397**, 153–163.
- UCHIYAMA, T. (1975b). *unvollständige Literaturangabe*. lediglich erwähnt in Europäischer Patentanmeldung EP336376.
- UCHIYAMA, T. (1993). Chemical structure and characteristics. *Seiten 169–190 in*: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N. J. (Editoren), *Science and Technology of Fructans*. Boca Raton: CRC Press.
- UCHIYAMA, T.; NIWA, S.; TANAKA, K. (1973). Purification and properties of *Arthrobacter ureafaciens* inulase II. *Biochimica et Biophysica Acta*, **315**, 412–420.
- UCHIYAMA, T.; TANAKA, K.; KAWAMURA, M. (1988). *Production of difructose dianhydride III*. Japanische Patentanmeldung JP1225492A2.
- UCHIYAMA, T.; KAMATA, A.; KUSANO, H. (1989). *Immobilized FTF enzymes*. Europäische Patentanmeldung EP336376.
- UEDA, M.; SASHIDA, R.; MORIMOTO, Y.; OHKISHI, H. (1994). Purification of inulin fructotransferase (DFA I-producing) from *Arthrobacter* sp. MCI-2493 and production of DFA I from inulin by the enzyme. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, **58**(3), 574–575.
- UNIFRANCK (2000). Entwicklung der UNIFRANCK Lebensmittelwerke GmbH, Ludwigsburg, <http://members.chello.at/a.glueck/kaffee-ersatz.htm>.
- VAN BALKEN, J. A. M.; VAN DOOREN, T. J. G. M.; VAN DEN TWEEL, W. J. J.; KAMPHUIS, J.; MEIJER, E. M. (1991). Production of 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1^F-fructosyltransferase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **35**, 216–221.
- VAN DER MEER, I. M.; EBSKAMP, M. J. M.; VISSER, R. G. F.; WEISBEEK, P. J.; SMEEKENS, S. J. M. (1994). Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plants. *Plant and Cell Physiology*, **6**, 61–571.
- VAN LEEUWEN, M. B.; JONGBOOM, R. O. J.; SLAGHEK, T. M. (1997). Adhesives based on inulin for industrial application. *In: Proceedings of the 4th International Workshop on Carbohydrates as Organic Raw Materials (Wien)*.

- VASIČ-RACKI, D.; JONAS, M.; WANDREY, C.; HUMMEL, W.; KULA, M.-R. (1989). Continuous (R)-mandelic acid production in an enzyme membrane reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **31**, 215–222.
- VINKE, P.; VON DAM, H. E.; VAN BEKKUM, H. (1990). Platinum catalyzed oxidation of 5-hydroxymethylfurfural. *Seiten 147–157 in: New Developments in Selective Oxidation*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V.
- VORLOP, K.-D. (1984). *Entwicklung von Verfahren zur Polymerfixierung von Mikroorganismen und Anwendung der Biokatalysatoren zur Spaltung von Penicillin G und Synthese von L-Tryptophan*. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- VORLOP, K.-D.; BREFORD, J. (1994). *Verfahren zur Herstellung von Teilchen aus einem flüssigen Medium*. Deutsche Patentanmeldung DE4424998.
- VORLOP, K.-D.; REMMERS, P. (1991). *Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren*. Europäische Patentanmeldung EP0478097.
- WALT, D. R.; AGAYN, V. I. (1994). The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends Anal. Chem.*, **13**(10), 425–431.
- WALTER, M. (1996). *persönliche Mitteilung bei Projektauslegung*. F&E-Abteilung der Fa. Nordzucker AG (Braunschweig).
- WALTER, M. (1998). *persönliche Mitteilung*. F&E-Abteilung der Fa. Nordzucker AG (Braunschweig).
- WALTER, M. (2000). *Non-Food-Produkte aus Inulin, TVI: Biochemische Konversion*. Gemeinsamer Abschlussbericht der Projektbeteiligten. Projektträger: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (Gülzow).
- WALTER, M.; NEUBAUER, A.; BUCHHOLZ, K.; STOPPOK, E. (1995). *Verfahren zur Herstellung von Difructosedianhydrid III*. Deutsche Patentanmeldung DE19547095.
- WANDREY, C.; WICHMANN, R.; KULA, M.-R.; BÜCKMANN, A. F. (1984). Enzym-Membran-Reaktor. *Die Umschau*, **3**, 88–91.
- WANG, J. (2000). From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acid Research*, **28**(16), 3011–3016.
- WANG, X.; GIBSON, G. R. (1993). Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*, **75**, 373–380.
- WANKEN, E. (1997). *Delphi 3*. Bonn: Addison-Wesley.
- WATASE, M.; NISHINARE, K.; NAMBU, M. (1983). Anomalous increase of the elastic modulus of frozen poly (vinyl alcohol) gels. *Cryo-Letters*, **4**, 197–200.
- WEBB, S. (1998). Time resolved fluorescence based assays in screening for biocatalytic activities. *Seiten 87–101 in: KIESLICH, K.; VAN DER BEEK, C. P.; DE BONT, J. A. M.; VAN DEN TWEEL, W. J. J. (Editoren), New frontiers in screening for microbial biocatalysts*. Amsterdam: Elsevier.

- WEISS, N. (1998). *persönliche Mitteilung*. Identifizierungsdienst der DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig).
- WEISSWANGE, T. (1990). *Automatisierung und Miniaturisierung des Most-Probable-Number-Verfahren zur Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Kurven UV-bestrahlter Bakterien*. Dissertation, Technische Universität Berlin.
- WHITE, M. L.; DORION, G. H. (1961). Diffusion in a crosslinked Acrylamide polymer gel. *Journal of Polymer Science*, **55**, 731–740.
- WITTLICH, P.; SCHLIEKER, M.; WILLKE, T.; VORLOP, K.-D. (1999). Leistungssteigerung biotechnologischer Prozesse durch neuartige Immobilisierungsmethoden für Biokatalysatoren am Beispiel der 1,3-Propandiol-Herstellung. In: *Proceedings des 2. Workshops Bio-konversion nachwachsender Rohstoffe (Braunschweig)*.
- WOESE, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, **51**, 221–271.
- YAZAWA, K.; IMAI, K.; TAMURA, Z. (1978). Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilisable by bifidobacteria. *Chemical and Pharmacological Bulletin*, **26**, 3306–3311.
- YELLOWSTONE NATIONAL PARK (1999). Internet-Darstellung, <http://www.nps.gov/yell/nature/>.
- YOKOTA, A.; HIRAYAMA, S.; ENOMOTO, K.; MIURA, Y.; TAKAO, S.; TOMITA, F. (1991a). Production of inulin fructotransferase (depolymerizing) by *Arthrobacter* sp. H65-7 and preparation of DFA III from inulin by the enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **72**(4), 258–261.
- YOKOTA, A.; ENOMOTO, K.; TOMITA, F. (1991b). Purification and properties of an inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter* sp. H65-7. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **72**(4), 262–265.
- YOKOTA, A.; YAMAUCHI, O.; TOMITA, F. (1995). Production of inulotriose from inulin by inulin-degrading enzyme from *Streptomyces rochei* E87. *Letters in Applied Microbiology*, **21**, 330–333.
- YUN, J. W. (1996). Fructooligosaccharides – occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, **19**, 107–117.
- YUN, J. W.; SONG, S. K. (1993). The production of high-content fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. *Biotechnology Letters*, **15**(6), 573–576.
- YUN, J. W.; CHOI, Y. J.; SONG, C. H.; SONG, S. K. (1999). Microbiol production of inulo-oligosaccharides by an endoinulinase from *Pseudomonas* sp. expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **87**(3), 291–295.
- YUN, J. W.; PARK, J. P.; SONG, C. H.; LEE, C. Y.; KIM, J. H.; SONG, S. K. (2000). Continuous production of inulo-oligosaccharides from chicory juice by immobilized endoinulinase. *Bioprocess Engineering*, **22**, 189–194.

- ZHAO, C. (1998). *Aufreinigung und Untersuchung zur Kristallisationskinetik sowie einige physikalische und chemische Eigenschaften von α -D-Fructofuranose- β -D-fructofuranose 2',1;2,3'-dianhydrid (DFA III)*. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ulrich Jahnz
Geburtsdatum	28.01.1969
Geburtsort	Minden/Westfalen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1975 – 1979	Grundschule Hausberge
1979 – 1988	Städtisches Gymnasium Porta Westfalica

Zivildienst

06/1988 – 02/1990	Jugendherberge Porta Westfalica-Hausberge
-------------------	---

Studium und weitere Ausbildung

10/1990 – 07/1996	Diplomstudiengang Biotechnologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhemina zu Braunschweig
08/1994 – 12/1994	Studienarbeit an der Heriot-Watt-University (Edinburgh, Schottland) unter Anleitung von Prof. Dr. F. G. PRIEST „An ecological study of mosquito pathogenic strains of <i>Bacillus sphaericus</i> using molecular techniques“
08/1995 – 07/1996	Diplomarbeit am Institut für Technologie der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL, Braunschweig) unter Anleitung von Prof. Dr. K.-D. VORLOP „Fermentation von Nitrifikanten mit anschließender Immobilisierung und Trocknung zur Herstellung von Starterkulturen“
22.07.96	Abschluss als Diplom-Biotechnologe
09/1996 – 07/2000	Promotionsarbeit am Institut für Technologie und Biosystemtechnik der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) unter Anleitung von Prof. Dr. K.-D. VORLOP „Screening-Automation auf Basis hohlkugelverkapselter Zellen und enzymatische Bildung von Diffructoseanhydrid III aus Inulin unter thermophilen Bedingungen (Screening, Charakterisierung, Immobilisierung)“

weitere Tätigkeiten

seit 11/1998	Geschäftsführer der geniaLab GmbH
seit 09/2000	wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Technologie der Kohlenhydrate der TU Braunschweig

Ulrich Jahnz
Mittelweg 37, 38106 Braunschweig

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich

1. die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Screening-Automation auf Basis hohlkugelverkapselter Zellen und enzymatische Bildung von Difructoseanhydrid III aus Inulin unter thermophilen Bedingungen (Screening, Charakterisierung, Immobilisierung)

selbstständig verfasst,

mit Genehmigung des Vorsitzenden der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Braunschweig, vertreten durch den Mentor der Arbeit, vom 04. Juli 2001 bereits teilweise veröffentlicht,

nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet

und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben,

2. früher ein Promotionsgesuch noch nicht eingereicht habe.

Datum:

(Unterschrift)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

JAHNZ, U., SCHUBERT, M., BAARS-HIBBE, H., WALTER, M., VORLOP, K.-D. (2000). Thermotolerant inulase II for production of DFA III from inulin. *In: Biotechnology 2000 - World Congress on Biotechnology (Berlin)* Abstracts, **1**, 289.

SCHUBERT, M., JAHNZ, U., VORLOP, K.-D. (2001) Gentechnisches Enzymdesign und Fremdenexpression: thermostabile Inulase II zur Produktion von DFA III aus Inulin. *In: 19. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen (Leipzig)* Kurzfassungen der Vortrags- und Posterpräsentationen, 59.

JAHNZ, U., SCHUBERT, M., BAARS-HIBBE, H., WALTER, M., VORLOP, K.-D. (2001) Thermotolerante Inulase II für die Herstellung von DFA III aus Inulin. *In: 7. Symposium Nachwachsende Rohstoffe für die Chemie (Dresden)* Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe, Landwirtschaftsverlag Münster (im Druck).